

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNY AKTIVITY A OBSAHU ENZYMU RUBISCO V LISTECH
ŠPENÁTU V PRŮBĚHU DNE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

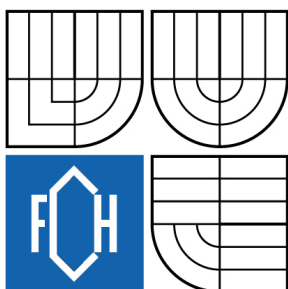
AUTHOR

Bc. JANA RIEGEROVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNY AKTIVITY A OBSAHU ENZYMU RUBISCO V LISTECH ŠPENÁTU V PRŮBĚHU DNE

DIURNAL CHANGES OF RUBISCO ACTIVITY AND ITS CONTENT IN SPINACH LEAVES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. JANA RIEGEROVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0248/2008	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jana Riegerová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce:	PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce:		

Název diplomové práce:

Změny aktivity a obsahu enzymu Rubisco v listech špenátu v průběhu dne

Zadání diplomové práce:

Sledovat změny aktivity, aktivace a obsahu enzymu Rubisco u špenátu v průběhu zamračeného a slunného dne. Z průběhu počáteční a celkové aktivity a obsahu Rubisco odvodit mechanismus regulace aktivity tohoto enzymu.

Termín odevzdání diplomové práce: 4.1.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jana Riegerová
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Byla zjišťována denní změna aktivity a obsahu enzymu ribulosa-1,5-bisfosfát (Rubisco). Počáteční a celková aktivita byly měřeny v extraktu z listů špenátu (*Spinacia oleracea* L.) pěstovaného na záhonu. Vzorky listů byly sbírány během dvou dnů s extrémně odlišnou radiací. Radiace zjištěná během zataženého dne byla velmi nízká a její maximum bylo pouze $236 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, naopak slunečný jasný den měl ozáření vysokou (od 8:00 do 18:00 byla ozáření vyšší než $600 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, maximum bylo $1591 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$). U obou dnů byl u vzorků odebraných za časných ranních hodin zjištěn vliv nočního inhibitoru CA1P, který se stoupající světelnou ozářeností klesal. V průběhu zataženého dne hodnoty počáteční aktivity kolísavě stoupaly až do poledne. Počáteční aktivita měla dvě maxima, první bylo ve 12 hodin a druhé maximum bylo dosaženo po polední depresi v 18 hodin. Celková aktivita měla maximum ve 12 hodin. Maximum počáteční a celkové aktivity u slunečného dne bylo v 16 hodin a poté následoval pokles. Obsah enzymu se během zataženého dne pohyboval mezi $3,62 \text{ g m}^{-2}$ a $5,00 \text{ g m}^{-2}$ a u slunečného dne od $3,30 \text{ g m}^{-2}$ po $4,97 \text{ g m}^{-2}$.

ABSTRACT

In this work were measured diurnal changes of activity and content of enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). The initial and the total activity were measured in extract of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leafs, which was field-grown. Samples of leafs were collected during two days. The first day was cloudy and the second one was sunny. Detected irradiation during cloudy day was at very low level, the maximal irradiation value was only $236 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. By the contrast the maximal value of sunny day was $1591 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. The effect of inhibitor CA1P (the nocturnal inhibitor) was detected in the samples, which were collected in early morning hours in both days. The CA1P effect decreased with increasing irradiation. On the 20th May 2008 (cloudy day), initial activity value increased during the whole morning. The initial activity had two maxima, first one was measured at 12 o'clock and the second maximal value after midday depression at 18 o'clock. The total activity had only one main maximum at 12 o'clock. The diminution of initial activity (midday depression) was larger by initial activity then by total activity. On the 30th May 2008 (sunny day), the initial and the total activities increased till 16 o'clock and then decreased. On the 20th May 2008 the enzyme content reached values between 3.62 g m^{-2} and 5.00 g m^{-2} and on the 30th May 2008 from 3.30 g m^{-2} to 4.97 g m^{-2} .

KLÍČOVÁ SLOVA

Fotosyntéza, obsah Rubisco, aktivita Rubisco, denní chod, špenát

KEYWORDS

Photosynthesis, Rubisco content, Rubisco activity, diurnal changes, spinach

RIEGEROVÁ, J. *Změny aktivity a obsahu enzymu Rubisco v listech špenátu v průběhu dne*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 62 s. Vedoucí diplomové práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu diplomové práce, PhDr. Miroslavu Hrstkovi Ph. D. za konzultace a jeho rodině za poskytnutí záhonu se špenátem.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. FOTOSYNTÉZA.....	11
2.2. CALVINŮV CYKLUS (PENTOSAFOSFÁTOVÝ CYKLUS)	13
2.2.1. <i>Regulační mechanismy Calvinova cyklu</i>	15
2.3. RIBULOZA 1,5-BIFOSFÁTKARBOXYLASA/OXYGENASA (RUBISCO).....	16
2.3.1. <i>Historie</i>	16
2.3.2. <i>Vlastnosti enzymu Rubisco</i>	16
2.3.3. <i>Struktura enzymu Rubisco</i>	16
2.3.4. <i>Biosyntéza</i>	17
2.3.5. <i>Mechanismus katalýzy</i>	18
2.3.5.1. <i>Karboxylace</i>	19
2.3.5.2. <i>Fotorespirace</i>	20
2.3.6. <i>Aktivace Rubisco</i>	21
2.3.6.1. <i>Spontánní aktivace</i>	21
2.3.6.2. <i>Aktivace prostřednictvím aktivas</i>	21
2.4. METODY STANOVENÍ AKTIVITY RUBISCO.....	23
2.4.1. <i>Gazometrické stanovení aktivity Rubisco (in vivo)</i>	23
2.4.2. <i>Spektrofotometrické stanovení (in vitro)</i>	23
2.4.3. <i>Radiometrické stanovení enzymu Rubisco</i>	24
2.5. METODY STANOVENÍ OBSAHU RUBISCO.....	25
2.5.1. <i>Gelová elektroforéza</i>	25
2.5.2. <i>Kapilární elektroforéza</i>	26
2.5.2.1. <i>HPLC</i>	27
2.5.3. <i>Imunologické metody</i>	27
2.5.3.1. <i>ELISA</i>	27
2.5.3.2. <i>Singl radialní imunodifuzní metoda</i>	27
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1. MATERIÁL.....	29
3.2. METODY.....	29
3.2.1. <i>Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco</i>	29
3.2.1.1. <i>Přístroje</i>	30
3.2.1.2. <i>Chemikálie</i>	30
3.2.1.3. <i>Příprava roztoků</i>	31
3.2.1.4. <i>Extrakce enzymů</i>	32
3.2.1.5. <i>Měření aktivity Rubisco</i>	33
3.2.1.6. <i>Výpočet aktivity enzymu Rubisco</i>	33
3.2.1.7. <i>Přístroje</i>	35
3.2.1.8. <i>Chemikálie</i>	35
3.2.1.9. <i>Příprava roztoků</i>	36
3.2.1.10. <i>Příprava standardů</i>	37
3.2.1.11. <i>Příprava vzorků pro stanovení SDS-PAGE</i>	38

3.2.1.12. Příprava gelů	38
3.2.1.13. Elektroforéza	39
3.2.1.14. Vizualizace bílkovin.....	40
3.2.1.15. Vyhodnocení gelů	40
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	42
4.1. VÝSLEDKY	42
4.2. DISKUSE	53
4.2.1. Aktivita enzymu Rubisco v průběhu dne.....	53
4.2.2. Obsah enzymu Rubisco v průběhu dne.....	54
5. ZÁVĚR.....	55
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	62

1. ÚVOD

Život na Zemi je závislý na schopnostech fotosyntetizujících organismů, které zajišťují potravu všem heterotrofním organismům. Fotosyntéza je v podstatě přeměna anorganického uhlíku na uhlík organický. Na počátku tohoto složitého procesu je navázání atmosférického oxidu uhličitého na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP) za vzniku dvou molekul 3-fosfoglycerátu. Reakci katalyzuje enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa. Tento enzym, pro něhož se vžila zkratka Rubisco, je klíčovým enzymem fotosyntézy a tvoří vstupní bránu anorganického uhlíku do biosféry.

Rubisco má velmi nízkou molekulovou aktivitu ($k_{\text{kat}} = 2\text{--}12 \text{ s}^{-1}$), a proto je ho v rostlinách potřeba velké množství, aby se udržela přijatelná rychlost fotosyntézy a rovnováha v ekosystémech a celé biosféře. Kromě své karboxylační funkce má Rubisco rovněž schopnost oxygenace RuBP (což vede k fotorespiraci) a slouží také jako depozit dusíku. Aktivita Rubisco závisí na obsahu enzymu, intenzitě fotosynteticky aktivní radiace, koncentraci CO_2 v chloroplastech a přítomnosti inhibitorů na aktivních místech Rubisco. Při nízkých koncentracích CO_2 v chloroplastu je aktivita Rubisco limitujícím faktorem rychlosti fotosyntézy.

Měnící se klima přináší více extrémně teplých dnů. Proto je důležité zjistit, jak se chovají rostliny za těchto podmínek, zda se zvýší výkonnost fotosyntézy anebo naopak, zda se prodlouží polední deprese. Během polední deprese se činnost fotosyntézy snižuje. Pokud by došlo k jejímu prodloužení vlivem změny klimatu, mohlo by docházet např. ke snížení výnosů plodin, změnám obsahu kyslíku v atmosféře atd.

Předložená práce se zabývá změnou aktivity a obsahu enzymu Rubisco u špenátu (*Spinacia oleracea* [L.]) v průběhu dvou klimaticky extrémně odlišných dnů. První byl zatažený a chladný s občasnými přeháňkami a jeho maximální ozáření byla $236 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Naopak druhý byl jasný, slunečný s tropickými teplotami, přičemž maximální ozáření dosáhla až $1591 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Rostliny špenátu byly pěstovány v polních podmínkách.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Fotosyntéza

Každý rok je díky fotosyntéze přeměněno okolo 10^{11} t CO_2 na organický materiál [1]. Při jejím průběhu dochází k přeměně látek anorganických na látky organické, které jsou následně využívány jak organismy fotosyntetizujícími (autotrofními), tak i organismy, které nejsou schopny fotosyntézu provádět (heterotrofní organismy). Fotosyntéza probíhá jak u organismů eukaryontních (vyšších rostlin a zelených a hnědých řas), tak i u organismů prokaryontních (sinic, zelených a purpurových bakterií).

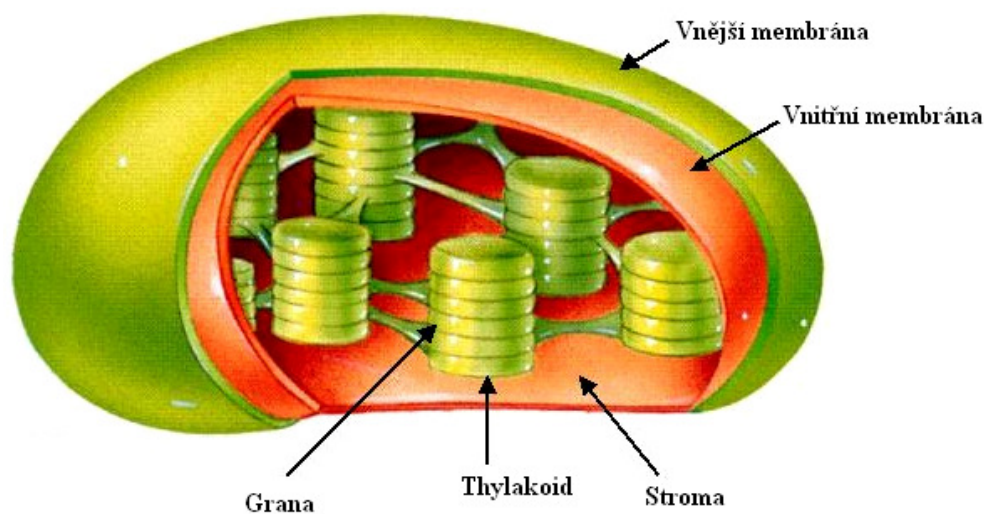
U vyšších rostlin probíhá fotosyntéza v zelených částech rostlin, které obsahují fotosyntetická barviva. Hlavním fotosyntetickým barvivem je chlorofyl (přírodní zelené barvivo). Chlorofyl se dělí na dva hlavní typy, chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Jejich vzájemná odlišnost spočívá v substituci aldehydové skupiny u chlorofylu *b* a methylové skupiny u chlorofylu *a* na třetím uhlíku. Tento rozdíl struktury způsobuje zachycování odlišných oblastí světla. Maximální absorpce chlorofylu *a* je při $\lambda = 430$ a $\lambda = 662$, zatímco maximální absorpce chlorofylu *b* je při $\lambda = 453$ a $\lambda = 642$. [2]

Dalšími důležitými barvivy jsou xantofyly a karoteny. Tato barviva se nacházejí v barevných částech rostlin (květy, listy atd.) a využívají jinou část světelného spektra než chlorofyly [3], [4].

Tato práce se zabývá fotosyntézou u vyšších rostlin, a proto bude dále popsán pouze průběh fotosyntézy u této skupiny organismů

Pokud se zamyslíme nad podstatou fotosyntézy, lze ji jednoduše popsat jako přeměnu anorganických látek na látky organické za přítomnosti energie a vody. Tato zdánlivě jednoduchá definice však v sobě skrývá velmi složité procesy.

Fotosyntéza probíhá v rostlinné buňce v chloroplastech. Chloroplasty se skládají ze systému selektivně propustných vnějších a vnitřních membrán. Skládáním membrán vznikají lamely-thylakoidy, které se dále spojují do zrněk (navzájem propojených gran). Systém propojení thylakoidů je pro názornost ukázán na obr. 1. Systém thylakoidů je obklopen kapalnou výplní stroma (uvnitř thylakoidů se pak nachází lumen). [3]



Obr. 1 Chloroplast [4]

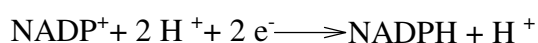
Fotosyntéza se skládá ze dvou fází, které se vzájemně doplňují. Světelná fáze probíhá v kvantosomech (základní jednotka thylakoidů) a temnostní fáze v kapalně výplni chloroplastu (stromatu). Světelná fáze vyžaduje, jak už napovídá název, přímou účast světla. Naopak temnostní fáze jeho přítomnost nepotřebuje. Temnostní fáze bude podrobněji popsána níže v této práci.

Světelná fáze probíhá ve fotosystému I a fotosystému II, jehož součástí je i tzv. Hillova reakce.

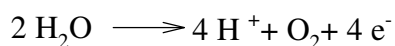
Pro započetí první reakce fotosyntézy je nutný dopad a zachycení fotonu vyzářeného sluncem, který musí mít vhodnou vlnovou délku (absorbováno je hlavně modré a červené spektrum světla). Světlo je nejprve zachycováno chlorofylem v tzv. anténovém komplexu, ze kterého je převáděno do reakčního centra. V reakčním centru dochází k převedení světelné energie na energii elektrickou a vznikají zde volné elektrony, které se dále využívají. [5]

Světelná fáze může probíhat cyklicky nebo necyklicky (častější případ).

Při necyklické fotofosforylaci je excitován elektron ve fotosystému I ($P^* 700$) a přechází na bílkovinu ferredoxin. Jeho redukovaná forma předává elektrony na $NADP^+$, který se následně přemění na NADPH (velmi důležité redukční činidlo využívané pro redukci CO_2). Potřebný proton přichází z fotosystému II, z fotolýzy vody. Elektron se již poté není schopen vrátit do původního stavu, a proto je tento děj označován jako necyklický elektronový tok. K regeneraci fotocenter chlorofylu je potřeba použít elektrony z oxidace vhodné sloučeniny, která funguje jako donor. Necyklický tok je oxidoredukční proces, ve kterém dochází přenosu dvou vodíků z molekuly vody (redukovaný donor) na $NADP^+$, který je akceptorem.



Hlavní funkcí fotosystému II je fotolýza vody (Hilova reakce), při které dochází k uvolňování vedlejšího produktu kyslíku. Po pohlcení fotonu reakčním centrem ($P^* 680$) přechází elektron do excitovaného stavu a vstupuje na prvotního příjemce. Z něj pokračuje na plastochinon a soustavu dvou cytochromů. Při tomto sestupu na nižší energetickou úroveň elektron postupně uvolňuje energii, která je thylakoidní membránou využita na tvorbu energie ATP. Na konci řetězce vstupuje do $P^* 700$ a zaplňuje zde mezeru, která vznikla po excitaci elektronu. Jak již bylo řečeno, ve fotosystému II dochází k fotolýze vody. Forma $P^* 680$, za spoluúčasti Mn^{2+} , oxiduje vodu. Dochází ke štěpení vody na dva vodíkové ionty a k uvolnění kyslíku. Odebrané elektrony z vody regenerují oxidovaný chloroplast $P^* 680$ a protony jsou použity na redukci $NADP^+$. [3], [5]



Při cyklickém elektronovém toku není využíván fotosystém II a elektrony se z ferredoxinu vracejí zpět na začátek systému přes komplex cytochromů. Elektrony jsou excitovány (převedeny na vyšší energii) a získávají záporný redox-potenciál. Elektrony ve fotosyntetickém centru I ($P^* 700$) přecházejí přes systém oxidoreduktas, čímž dochází k postupnému přechodu na nižší energetickou hladinu. Pokud by toto nenastalo, došlo by k uvolnění velkého množství energie najednou, to by mělo za následek zničení buňky. Energie získaná z vybuzeného elektronu je využita na přeměnu adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP). Nevzniká však žádný NADPH.

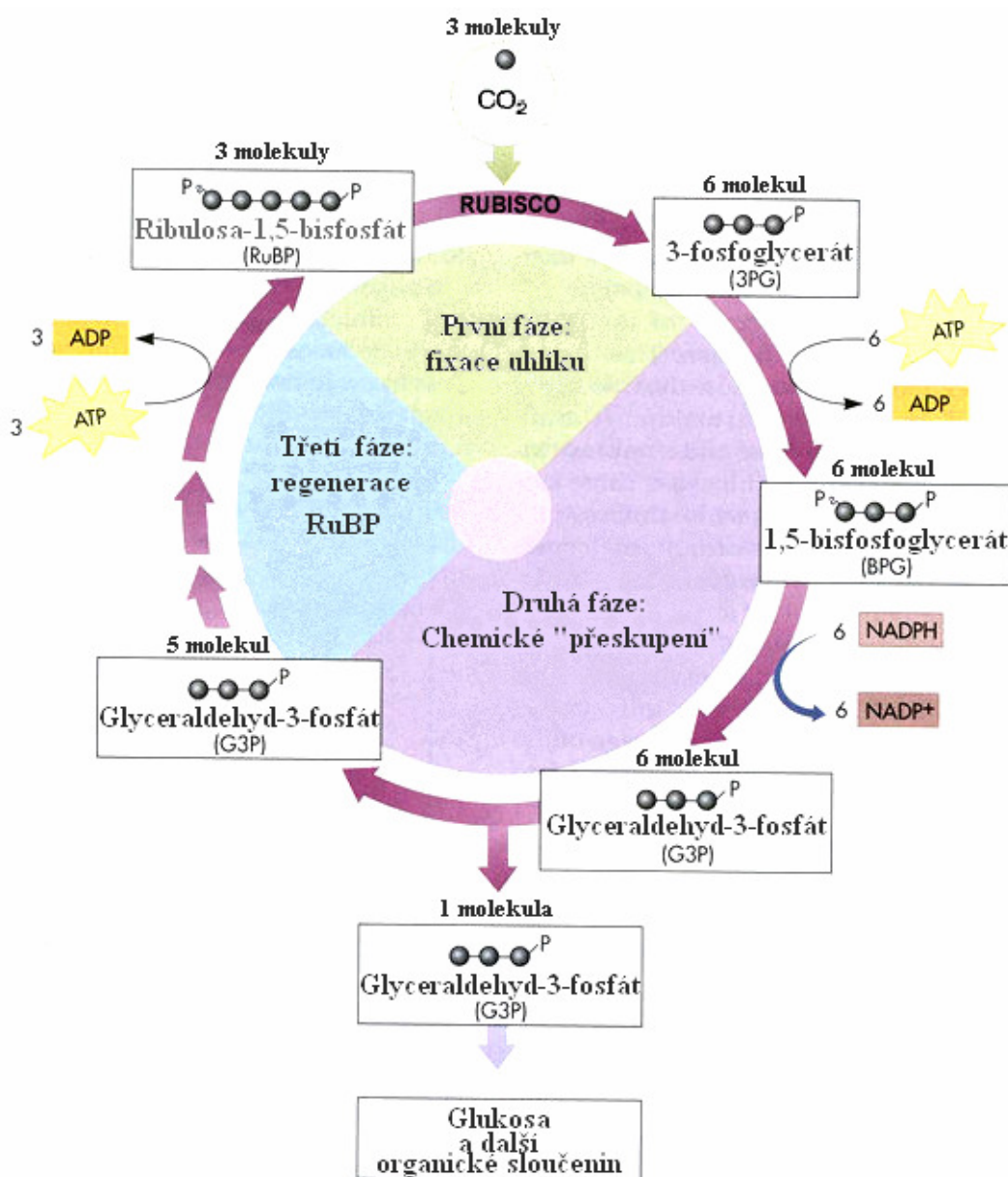
Tato metabolická dráha probíhá ve stromatu chlor

Calvinův cyklus lze rozdělit do dvou až tří fází. Ve dvoufázovém systému se rozlišuje fáze

Ve fázi produkční dochází k reakci tří molekul CO_2 se třemi molekulami RuBP.

fosfoglycerátu. Reakce samozřejmě probíhá se všemi třemi vstupujícími molekulami CO_2 , a proto je celkové množství vzniklého 3-fosfoglycerátu šest molekul.

V dalším kroku přechází reversibilně γ -fosfát z ATP na karboxylovou skupinu 3-fosfoglycerátu a vzniká šest molekul 1,5-bisfosfoglycerátu. Redukční reakce je katalyzována fosfoglycerátkinasou. Vytvořený 1,5-bisfosfoglycerát podléhá další reakci, která je katalyzována glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasou. Výsledkem této reakce je vysoce reaktivní thioesterová vazba. Karbonylová skupina je redukována na hemithioacetal hydridovým přesunem z NADPH. Rozštěpením hemithioacetalu je získáno šest molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu. Jedna molekula glycerinaldehyd-3-fosfátu odchází z cyklu a je použita pro biosyntetické účely (vzniká z něj glukosa a další cukry). Zbýlých pět molekul glycerinaldehyd-3-fosfátu pokračuje v cyklu a regeneruje původní substrát. [5], [7], [8]



Obr. 3 Schéma Calvinova cyklu [8]

Následující reakce Calvinova cyklu patří do fáze regenerační. Během jejího průběhu dochází k obnově cyklu do původního stavu. Výsledkem je regenerace tří molekul RuBP, které byly na začátku Calvinova cyklu.[5], [8]

Ze všech tří molekul CO₂, které vstoupily do cyklu, je v čistém zisku vytvořena jedna molekula glyceraldehyd-3-fosfátu. Na syntézu každé molekuly produktu se v produkční fázi spotřebuje devět molekul ATP a šest molekul NADPH. Naproti tomu ve fázi regenerační se již ATP ani NADPH nespotřebovává.[5], [8]

2.2.1. Regulační mechanismy Calvinova cyklu

Rostliny přes den svoji spotřebu energie kryjí fotosyntetickými reakcemi, ale přes noc, stejně jako jiné organismy, musí využívat zásoby živin, které přeměňují na potřebnou energii řadou metabolických drah (např.: glykolýza, pentosafosfátová dráha atd.). Z toho vyplývá nutnost existence regulačního systému, který určuje, za jakých podmínek má probíhat fotosyntéza nebo Calvinův cyklus. [5]

Nejvýznamnější regulátory Calvinova cyklu jsou enzymy Rubisco, fruktosabisfosfatasa a sedoheptulosabisfosfatasa. Uvedené enzymy jsou ovlivňovány následujícími faktory:

- Intenzita světla
- Změna pH
- Koncentrace Mg²⁺ iontů
- Koncentrace NADPH

U enzymu Rubisco se projeví změna pH ve stromatu, které se při zvýšené intenzitě světla zvýší ze 7,0 na 8,0. Zvýšením pH dojde k aktivaci enzymu Rubisco. Neopomenutelný je také vliv inhibitorů, které se vážou pevně na aktivní centrum Rubisco a znemožňují katalýzu. Jeden z nejvýznamnějších inhibitorů je CA1P (2-karboxy-D-arabino-1-fosfát), který se označuje také jako noční inhibitor. Toto označení poměrně přesně vystihuje, za jakých podmínek působí. Jeho koncentrace se zvyšuje se snižujícím se slunečním zářením a naopak dochází k jeho odbourávání při zvyšujícím se ozáření. Proto, aby docházelo k aktivaci Rubisco za požadovaných podmínek, je nutný regulační systém, který jasně určuje podmínky aktivace a deaktivace. Regulační mechanismy, které ovlivňují aktivitu Rubisco, jsou:

- světelná závislost aktivace aktivasy Rubisco,
- inhibice CA1P
- inhibice pomocí metabolitů ve stromatu.[9]

Regulační systém v buňce (tzv. druhý regulační systém), je zajišťován pomocí thioredoxinu, který reaguje na změnu oxidačně-redukčního potenciálu ve stromatu. Redukovaný thioredoxin aktivuje FBPasu a SBPasu, které se pak mohou zapojit do Calvinova cyklu. Pokud je thioredoxin inaktivovaný, nemůže probíhat Calvinův cyklus, ale je umožněn průběh glykolýzy. Thioredoxin lze reversibilně redukovat díky tomu, že obsahuje disulfidické skupiny.[5]

2.3. Ribulosa 1,5-bifosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)

2.3.1. Historie

Rubisco bylo objeveno v roce 1947 Wildmanem a Bonnerem, kteří provedli elektroforézu vzorků z listového extraktu. Při vyhodnocování gelů byl detekován významně zastoupený rozpustný protein, který byl nazván Frakce I. Krátce na to byla provedena další studie zabývající se fotosyntetickými reakcemi. Při dalším zkoumání bylo zjištěno, že objevená Frakce I je enzymaticky aktivní a katalyzuje karboxylaci RuBP. Enzym byl pojmenován ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa. Po objevení jeho další důležité funkce v Calvinově cyklu – oxygenace RuBP, bylo jeho původní pojmenování nutné upřesnit. Název byl proto změněn na ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa a časem se vžila zkratka Rubisco.[7], [10]

Následující studie enzymu a výsledky experimentů ukazovaly, že se jedná o enzym nesmírně důležitý. Výzkum Rubisco se následně zabýval jeho strukturou, jeho významem při fotosyntéze a také mechanismem reakcí, ve kterých působí. První strukturní model enzymu Rubisco byl navržen Schneiderem [10]. Byl založen na difrakčních datech dimeru z *Rhodospirillum rubrum*. Model poskytl informace o organizaci domén, které představují L-podjednotky. Potvrzoval, že aktivní místo enzymu je rozděleno mezi součásti obou podjednotek dimeru. Mechanismus katalýzy Rubisco byl zkoumán RTG krystalografií, mutační analýzou, biochemickými technikami atd. [7], [10]

2.3.2. Vlastnosti enzymu Rubisco

Rubisco, enzym katalyzující fixaci CO₂, patří mezi nejvýznamnější enzymy, neboť na jeho aktivitě závisí vznik organických látek v biosféře. Tvoří přibližně 15 % chloroplastových proteinů a stává se tak nejhojnějším proteinem v biosféře. Velké množství je nezbytné, protože jeho molekulová aktivita je velmi malá ($k_{\text{kat}} = 2\text{--}12 \text{ s}^{-1}$) [11]. Pokud rostlina chce provádět fotosyntézu účinně, je nezbytné vysoké množství enzymu.[5], [12]

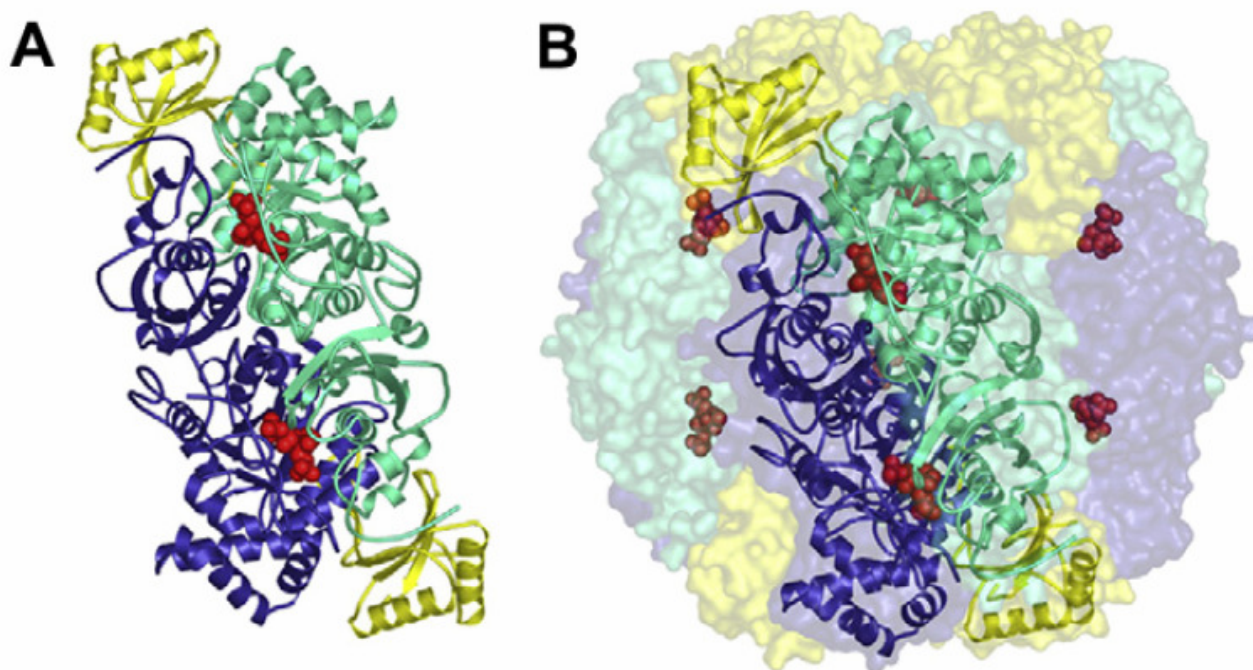
2.3.3. Struktura enzymu Rubisco

Existují dvě hlavní strukturní formy Rubisco rozdílného složení. Nejjednodušší forma enzymu se nachází v některých fotosyntetizujících bakteriích a označuje se jako Forma II. Tato forma Rubisco se vyskytuje ve formě dimeru L-podjednotek (například u nepurpurové sirné bakterie *Rhodospirillum rubrum*). Forma II neumožňuje existenci organismu v přítomnosti atmosférické koncentrace CO₂, protože molekulový kyslík inhibuje karboxylační reakci. Jiné bakterie, které také mají formu II, jsou schopné změnit formu II na účinnější formu I. Díky této změně mohou přežívat i v prostředí s mírně zvýšenou hladinou kyslíku.[10]

Nejčastější forma enzymu Rubisco je Forma I, která se vyskytuje u všech vyšších rostlin, ale také u chemoautotrofních bakterií, cyanobakterií, hnědých a červených řas. Forma I je sestavena ze dvou velikostně odlišných podjednotek, z L-podjednotek (52–55 kDa) a z S-podjednotek (12–18 kDa). Velké podjednotky jsou spojené s osmi S-podjednotkami uspořádaných jako tetrametr dimerů rozdělených okolo čtyř rýhových os symetrie. Čtyři S-podjednotky jsou umístěny blízko ke každému pólu z těchto os. Molekula obsahuje 422 vnitřních symetrií a skládá se z jádra tvořeného čtyřmi L₂ dimery uspořádaných dokola čtyř rýhových os. Na konci každého L₂ dimeru jsou čtyři malé podjednotky. Tyto podjednotky však nejsou nezbytné pro katalytickou aktivitu enzymu. [10], [13]

Aktivní místo je tvořeno C-koncem domény z L-podjednotky dimeru a N-konce domény z druhé L-podjednotky dimeru. Pokud enzym není aktivní, jeho aktivní místa jsou otevřená aktivačním kofaktorům a bisfosfátovému substrátu. Po navázání ribulosa-1,5-bisfosfátu na aktivní místo dochází k uzavření aktivního místa, vytvoření karbamátu a následně ke koordinaci s Mg^{2+} . [10], [13]

Zkoumání struktury Rubisco byla podrobena i skupina archea, která patří mezi anoxygenní (anaerobní). Bylo zjištěno, že Rubisco u archeí tvoří dekamer $(L_2)_5$, který byl označen jako forma III. Později však byla tato forma přiřazena k formě II. [13]



Obr. 4 Schéma enzymu Rubisco ze špenátu: A zobrazuje L_2S_2 podjednotky, modrou a zelenou jsou zobrazeny L-podjednotky a žlutě S-podjednotky. Červená představuje substrát. B kompletní hexadekamer (L_8S_8) jsou zde patrné rýhové osy [13].

2.3.4. Biosyntéza

Hexadekamer Rubisco je složen z osmi velkých podjednotek L a osmi malých podjednotek S. Každý typ podjednotky je syntetizován odděleně. Jejich genomy jsou kódovány v odlišných buněčných kompartmentech. S-podjednotky jsou kódovány geny *rbcS* v jaderném genomu jako multigen rodiny v rozsahu od 2 do 12 členů. Expres *rbcS* je regulována mnoha exogenními a endogenními faktory, jako je například světlo, tma, teplota, koncentrace atmosférického CO_2 atd., které buď expresi podpoří, nebo ji omezují. Pozitivní i negativní regulační sekvence jsou umístěny v *cis*-aktivních transkripčních kontrolních oblastech. Po transkripci v jádře *rbcS* mRNA proběhne translace na 80S ribozomech v cytosolu, za vzniku prekurzoru proteinu S-podjednotek (preS-podjednotka). U preS-podjednotky je na N-konci takzvaný přenosový protein, který je potřebný pro její nasměrování do chloroplastu. Po přenesení preS-podjednotky přes vnější membránu chloroplastu, pomocí proteinů teplotního šoku, je preS-podjednotka přenesena do stromatu v chloroplastu.

Ve stromatu poté dochází k oddělení přenosového proteinu za následného vzniku S-podjednotky. [10], [12]

L-podjednotky jsou kódovány *rbcL* geny, které se nachází v chloroplastovém genomu. Tyto geny jsou přepisovány plastidovou RNA polymerasou, která působí v expresi dalších genů vztahujících se k fotosyntéze. Navrhuje se, že L-podjednotky jsou pomocí translace přeloženy na membránovou vazbu ribozomů. Translace *rbcL* mRNA je zvýšena pomocí světla prostřednictvím aktivace prodlužujícího translačního procesu. Bylo navrženo, že toto světlem vyvolané zvýšení translačního prodloužení LSU na tylakoidové vazbě polyzómu je řízeno protonovým poklesem napříč tylakoidovými membránami. Specifická aktivita prodlužujícího faktoru a vyjádření faktoru jsou zvyšovány světlem. [10], [12]

Pomocí chaperonů jsou prekurzory S-podjednotek spojovány s L-podjednotkami v chloroplastu, aby vytvořily holoenzym a mohly katalyzovat karboxylační a/nebo oxygenační reakce.

2.3.5. Mechanismus katalýzy

Jak již bylo řečeno, Rubisco se zapojuje jak do reakce karboxylační, tak i do reakce oxygenační. Substráty CO_2 a O_2 mezi sebou soutěží o vazebné místo, jedná se tedy o kompetitivní inhibici.

Zjednodušeně lze kompetitivní inhibici vysvětlit jako soutěž mezi inhibitorem a substrátem o aktivní centrum enzymu. Inhibitor se buď může vázat přímo do vazebného centra, nebo v jeho blízkosti, ale i v tomto případě brání navázání substrátu. K bránění navázání substrátu může docházet pěti způsoby:

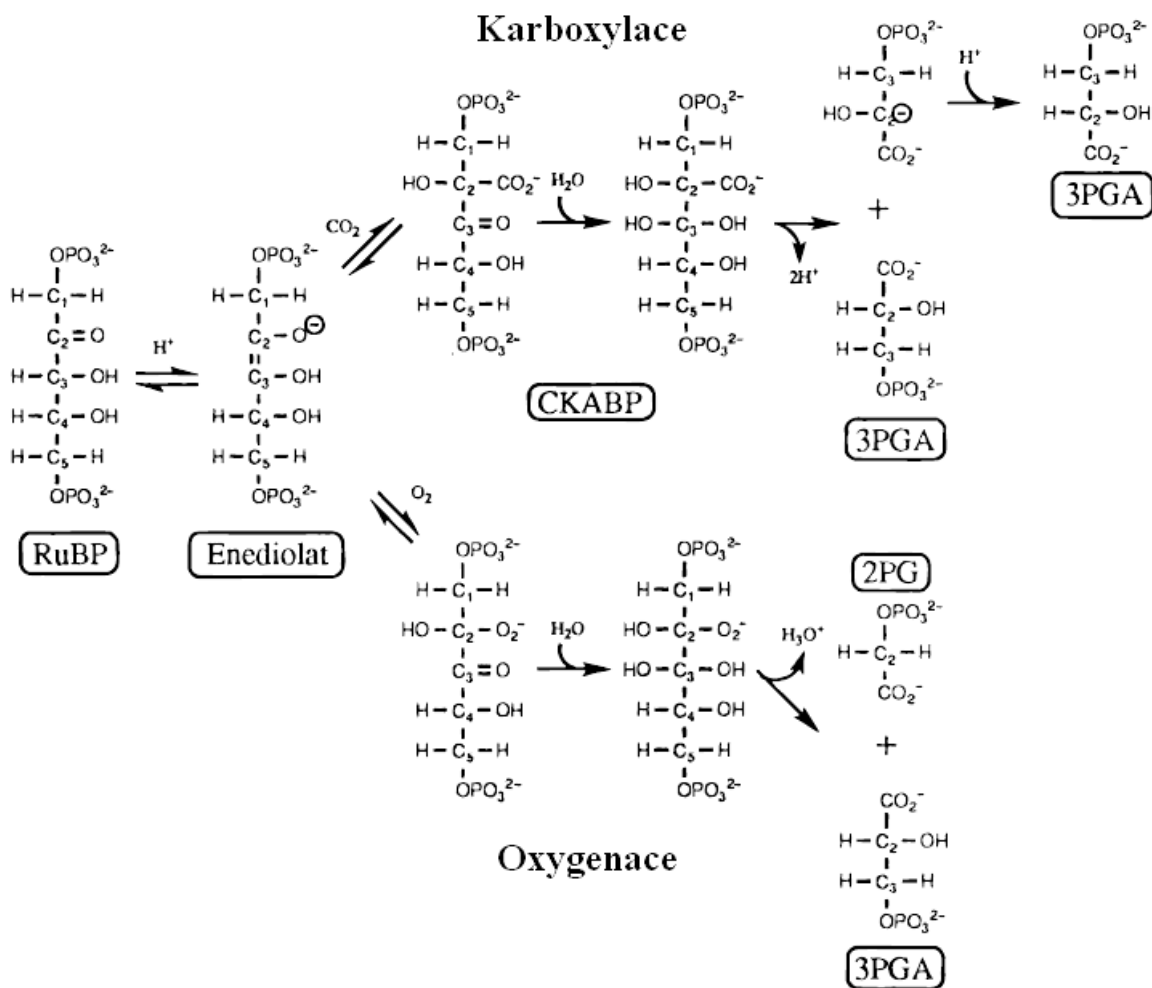
- klasický model (vazba inhibitoru do aktivního centra)
- stérické bránění
- vazba společnou vazebnou skupinou
- překryv vazebných míst
- konformační změny

Za inhibitor lze považovat O_2 , protože poté již nelze navázat CO_2 . Z toho vyplývá, že nevzniká ani požadovaný produkt glycerinaldehyd-3-fosfát. [13]

CO_2 zde má dvě funkce. Působí jako aktivátor pro obě reakce a také má funkci substrátu pro karboxylační reakci.

Aktivační proces se skládá z karbamylace aktivních míst lysinu 201 nesubstrátovým CO_2 a ze stabilizace Mg^{2+} iontu na karbamátu pomocí CO_2 . Samotný mechanismus reakce může být rozdělen do několika částí.

Reakce katalyzovaná enzymem Rubisco začíná vytvořením vazby mezi Rubisco a Rubisco aktivasou, přičemž se uvolní glykofosfát. Rubisco katalyzuje reakci fixace CO_2 . Při katalýze, během fixace CO_2 , nezávisí aktivace CO_2 na enzymu, ale je v dynamické rovnováze s okolním médiem. Mechanismus reakce zahrnuje aktivaci karbamylační reakce mezi CO_2 a ϵ -aminoskupinou lysinu 201 ve velké podjednotce a navázání Mg^{2+} za vytvoření katalyticky aktivního ternárního komplexu. Aktivita Rubisco se přizpůsobuje změnám intenzity světla zásobou CO_2 nebo O_2 během reversibilní karbamylace lysinu. Výsledný meziprodukt přechází v závislosti na podmínkách do fáze karboxylace nebo oxygenace. [9], [15], [16], [17]

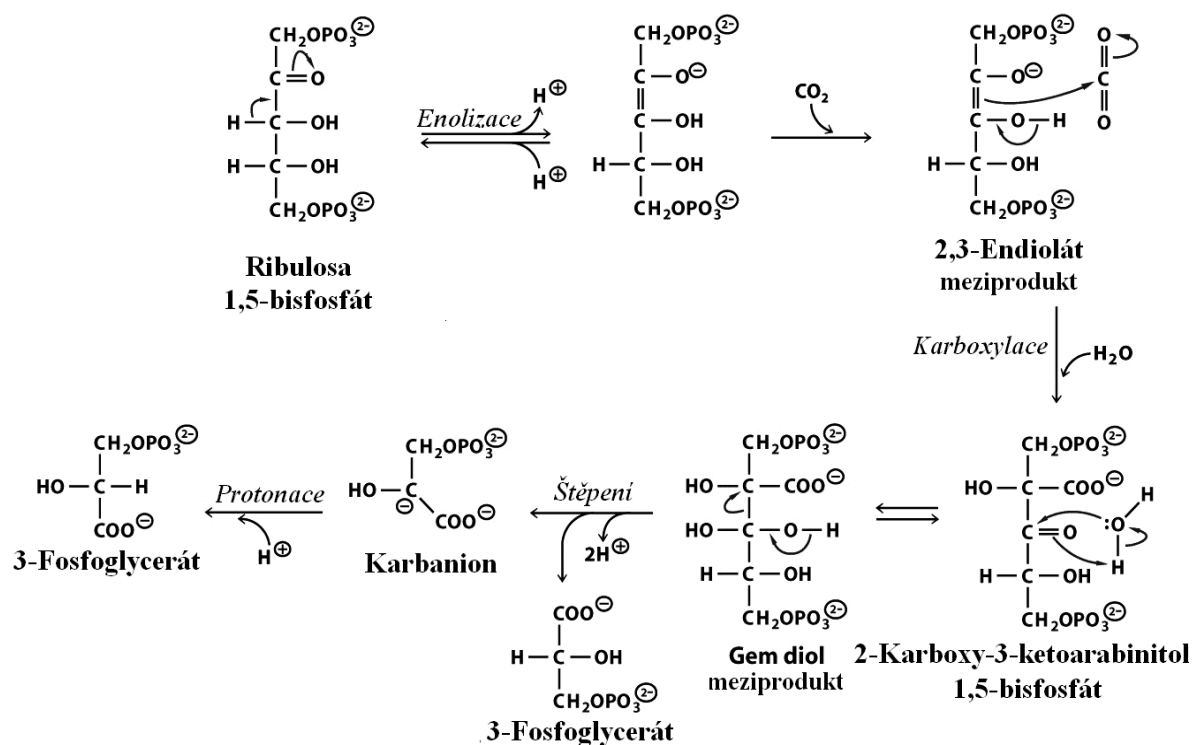


Obr. 5 Reakce katalyzované enzymem Rubisco: RuBP – ribulosa -1,5-bisfosfát; CKABP - karboxy-3-keto-D-arabonitol-1,5-bisfosfát; 3PGA - 3-fosfoglycerát; 2PG - 2-fosfoglykolát [17]

2.3.5.1. Karboxylace

Rubisco katalyzuje navázání CO₂, přičemž nejdříve vzniká šestiuhlíkatý meziprodukt. Na třetím uhlíku (C3) proběhne hydratace za vzniku geminální diolové formy. Následně odchází dva protony z hydroxylové skupiny 2-karboxy-3-keto-D-arabonitol-1,5-bisfosfátu (hydratovaný meziprodukt). Poté dochází u třetího uhlíku k rozštěpení uhlíkaté vazby za vzniku 3-fosfoglycerátu. Uvolněné protony jsou přijaty karbamátem na Lys201 a His 294. Předpokládá se, že karbamát přijme rezonanční formu, ve které je udržován negativní náboj na každém kyslíku karboxylové skupiny. Přítomný glyceraldehyd-3-fosfát se přetočí ven karboxylovou skupinou, která následně směřuje k roztoku. Obsazená poloha C3 na 2-karboxy-3-ketoarabonitol-1,5-bisfosfátu je nyní obsazena molekulou vody. Tímto pohybem není nicméně narušena zbývající část struktury a pozice stranových řetězců His 294 a karbamylované Lys 201, které jsou identické s těmi v komplexu 2CABP. Deprotonací geminálního diolu nastává rozštěpení uhlíkové vazby mezi 3. a 4. uhlíkem. Pro vytvoření

druhého produktu (3-fosfoglycerát) je vyžadována stereospecifická protonace karbaniontu. Jestliže protonace proběhne rychle, sníží se možnost vzniku vytvoření nestereospecifických produktů. Toto by mohlo znamenat, že se tento krok objeví před otevřením aktivního místa pomocí narušení smyčky 6 a N- a C- koncových oblastí, což je pravděpodobně pomalý proces vztahující se k zachycení protonu pomocí karbaniontu. [17]



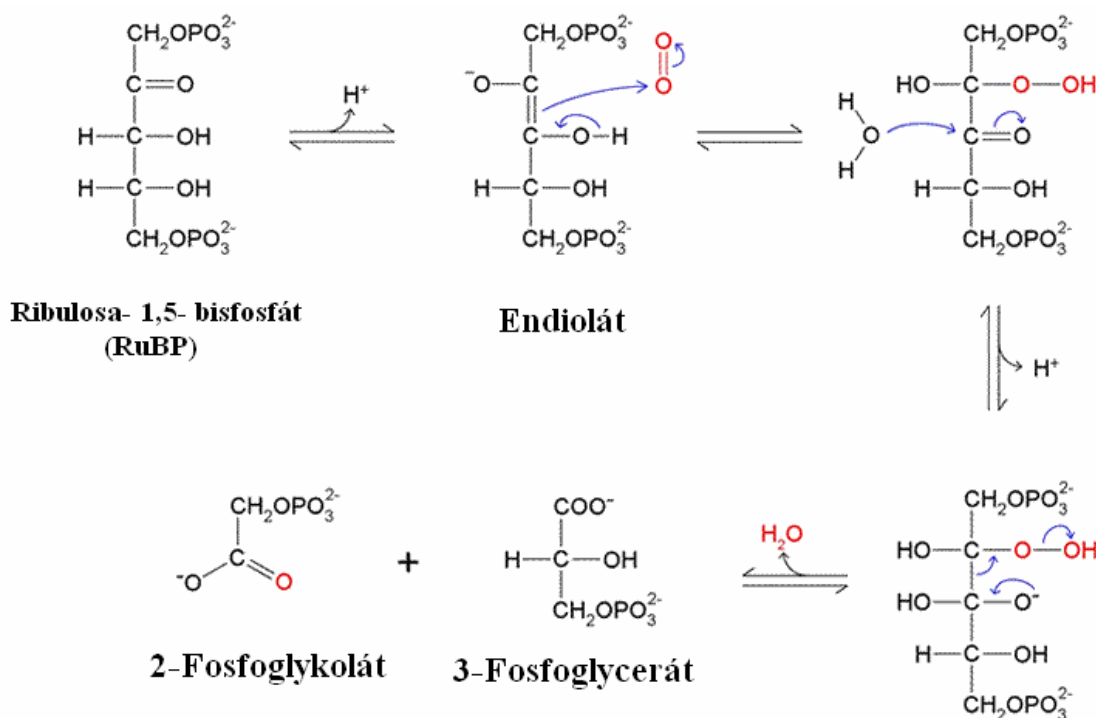
Obr. 6 Mechanismus karboxylace [18]

2.3.5.2. Fotorespirace

Jak již bylo řečeno, CO₂ a O₂ spolu soutěží o Rubisco. Při fotorespiraci vyhrává soutěž O₂ nad CO₂. Fotorespirace je prováděna v peroxisomech a v mitochondriích. Podobně jako karboxylaxe i oxygenace vyžaduje zbytek lysinu 201 v karbamátové formě. Mechanismus oxygenace je ukázán na (Obr. 7).

Při fotorespiraci dochází k rozštěpení předpokládaného hydroxylového meziproduktu za uvolnění fosfoglykolátu. Hydroperoxidový meziprodukt se stabilizuje nahrazením Mg²⁺ z aktivních míst Rubisco, kovovým iontem, který má vysokou afinitu ke kyslíku nebo hydroperoxidu např.: Mn²⁺ nebo Co²⁺. Nahrazení má za následek zvýšení specifity Rubisco pro oxygenaci. [5], [15]

Výslednými produkty jsou 3-fosfo-D-glycerát a 2-fosfoglykolát. Později se tyto molekuly částečně zapojují do fotorespiračního cyklu.



Obr. 7 Oxygenace [19]

2.3.6. Aktivace Rubisco

2.3.6.1. Spontánní aktivace

Aby bylo Rubisco schopné katalýzy, musí vytvořit komplex s CO₂ a Mg²⁺, tzv. musí být aktivováno. Fyziologická koncentrace CO₂ naprosto nedostačuje požadavkům na úplnou aktivaci. Obě formy, aktivní i neaktivní, jsou závislé na reverzní reakci CO₂ se zbytky lysinu za vzniku karbamátu, který je stabilizován ionty Mg²⁺. Karbamylace probíhá velmi pomalu a limituje tak vytvoření aktivního ternárního komplexu. Aktivace je také závislá na pH vnitřního prostředí. Vysoká acidita a selektivita při karbamylaci stabilizuje neprotonovanou ε-amino skupinu a vytváří potenciální gradient, který napomáhá přesunutí volného protonu v průběhu karbamylace. Pokud je RuBP pevně vázaný k inaktivní formě Rubisco, spontánní aktivace je inhibována. [7], [15]

2.3.6.2. Aktivace prostřednictvím aktivas

Pro urychlení aktivace enzymu jsou zapotřebí dvě aktivasy, aktivasa Rubisco a aktivasa CO₂.

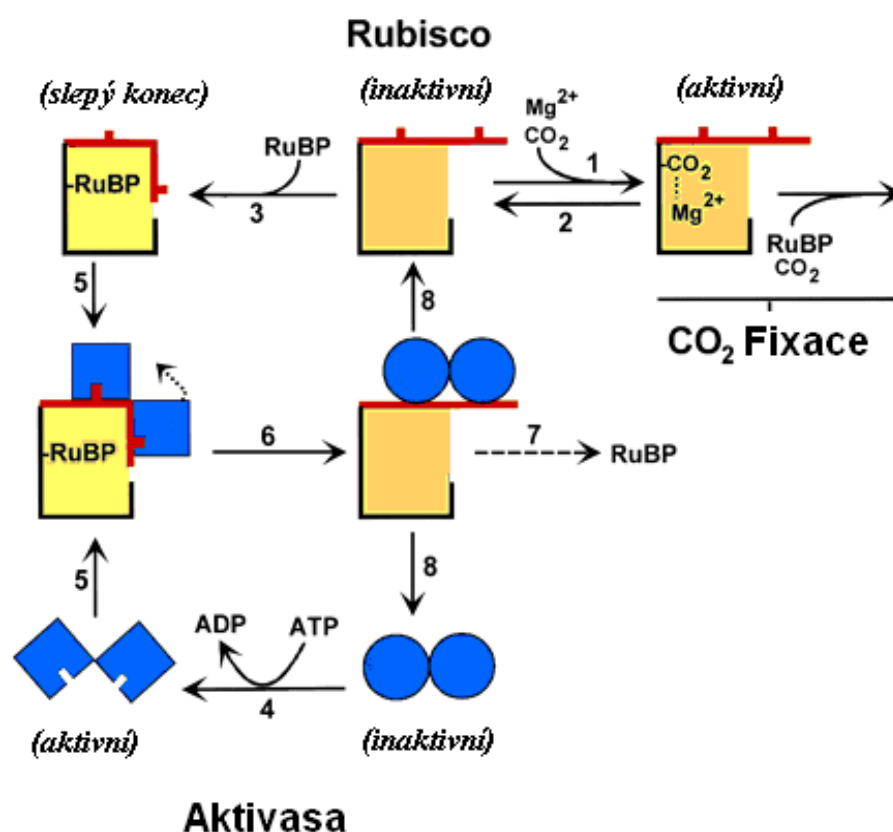
Samotné Rubisco, bez přítomnosti aktivas, nemůže být in vivo plně karbamylováno, protože koncentrace CO₂ i Mg²⁺ je pro spontánní aktivaci nedostatečná. Nejdůležitější vlastností aktivasy je, že dovoluje maximální aktivaci Rubisco při fyziologické koncentraci CO₂. Aktivasa Rubisco je kódována v jádře stejně jako S-podjednotky a skládá se ze dvou isoform. Rozpustný chloroplastový enzym přirozeně katalyzuje světlem vyvolanou aktivaci Rubisco. Aktivasa pro svoji funkci požaduje ATP hydrolasu, která ji aktivuje a také je důležitý poměr ADP/ATP. Ve tmě je jejich poměr (1:1) a aktivasa má minimální aktivitu. Ve světle je poměr ADP/ATP (1:2 až 1:3). Změna poměru ADP/ATP zřejmě dovoluje snižovat nebo zvyšovat činnost Rubisco. Aktivasa podporuje průběh karbamylace tím,

že specificky odstraňuje ligand z karbamylovaných a nekarbamylovaných míst Rubisco. Dokáže rozpoznat uzavřenou smyčku proteinové struktury Rubisco a navázat se do jeho katalytického místa. To způsobí otevření smyčky, uvolnění ligandu a poté aktivaci Rubisco. Aktivasa se následně navrácí do inaktivního stavu a čeká na další aktivaci. [7], [20], [21]

Uvedené schéma (

Obr. 8) zjednodušeně ukazuje aktivaci inaktivní formy Rubisco. V kroku 4 dochází k aktivaci aktivasy za štěpění ATP. Aktivovaná aktivasa se naváže na Rubisco (krok 5) a dojde ke změně její konformace (krok 6). To umožní uvolnit RuBP z aktivního místa Rubisco (krok 7). Na uvolněném aktivním místě následně proběhne karbamylace (krok 1) a nebo se na něj může opětovně navázat RuBP (krok 3). K opětovnému navázání RuBP také může dojít, když Rubisco spontánně ztratí CO_2 (proběhne dekarbamylace). RuBP se váže pevně na aktivní místa nekarbamylovaného enzymu a způsobí konformační změny. Takto vzniklý produkt se označuje jako „dead end“ (slepý konec).[23]

Bylo zjištěno, že *in vitro* může přechištěné Rubisco reagovat s CO_2 a s Mg^{2+} a vytvářet katalyticky aktivní ternární komplex enzym- CO_2 - Mg^{2+} . Jako i v předchozím případě, musí nejprve dojít k navázání CO_2 a až poté se může navázat Mg^{2+} . Vazba aktivátoru CO_2 měla za následek vznik karbamátu na zbytku lysylu 201. Také bylo dokázáno, že aktivační molekula CO_2 je odlišná od molekuly CO_2 , která vstupuje do karboxylační reakce jako substrát. [22]



Obr. 8 Schéma interakce Rubisco s aktivasou [23]

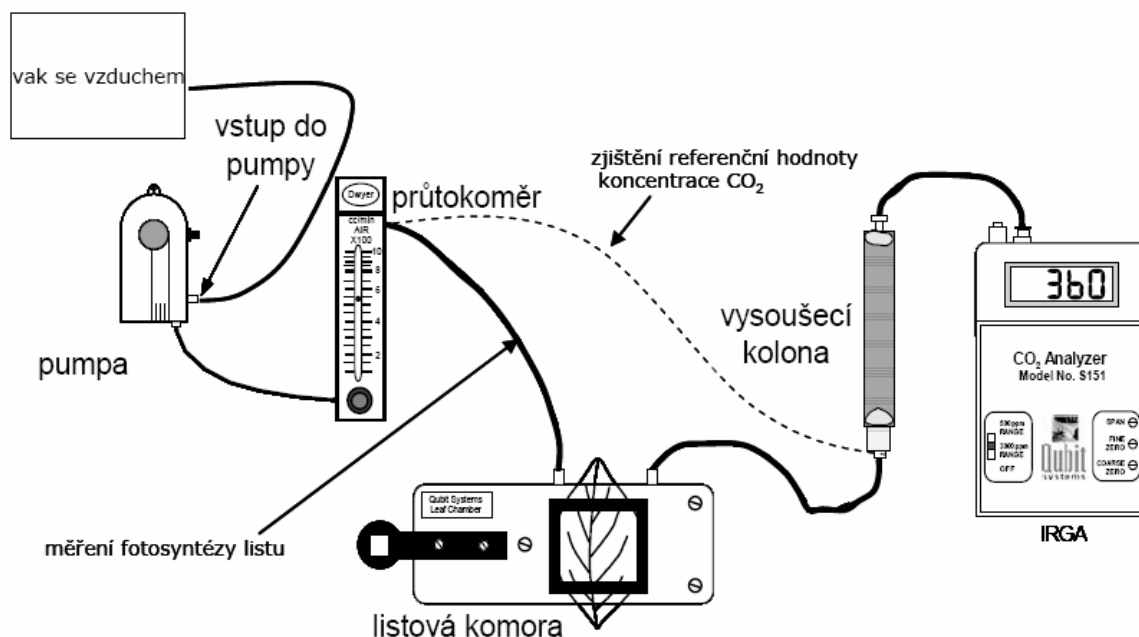
2.4. Metody stanovení aktivity Rubisco

2.4.1. Gazometrické stanovení aktivity Rubisco (*in vivo*)

Gazometrické metody se používají pro stanovení rychlosti fotosyntézy. List při fotosyntéze fixuje CO_2 a uvolňuje O_2 . Může však docházet k fotorespiraci, kdy se O_2 spotřebovává a naopak se uvolňuje CO_2 . Jejich příjem nebo výdej se projeví v okolní atmosféře rostliny úbytkem/nárůstem koncentrace CO_2 . Rychlost fotosyntézy se tedy může stanovit na základě výměny CO_2 nebo O_2 anebo obou plynů současně mezi rostlinou a okolní atmosférou. Principem gazometrické metody je měření rychlosti spotřeby CO_2/O_2 rostlinami. Měření se provádí měřením úbytku CO_2/O_2 v okolí rostliny, který je využit při fotosyntéze. [24], [25]

Stanovení, které je znázorněno na obrázku 9 se provádí v listu, který je neprodyšně uzavřen v listové asimilační komoře. Pro měření změny známé koncentrace CO_2 se často používá infračervený analyzátor plynu (IGRA). Rychlost probíhající fotosyntézy lze ovlivnit intenzitou ozáření a koncentrací CO_2 v okolní atmosféře. V IGRA lze stanovovat heteroatomické molekuly (CO_2), které z důvodu specifického absorpčního spektra každého plynu absorbují záření o určitých vlnových délkách. Naopak identické molekuly jako je například O_2 touto metodou stanovovat nelze, protože neabsorbují infračervené záření.

Úbytek CO_2 je v rovnováze přibližně po 10 minutách. Z naměřených dat lze vypočítat rychlost čisté fotosyntézy a rychlost výměny CO_2 na plochu listu. [24], [25], [26]



Obr. 9 Schéma gazometrického měření spotřeby CO_2 listem [24]

2.4.2. Spektrofotometrické stanovení (*in vitro*)

Spektrofotometrické stanovení patří mezi nejběžnější metody používané pro stanovení aktivity enzymu Rubisco. Stanovení je založené na změně absorbance při oxidaci NADPH. Během měření dochází k poklesu absorbance. Měření se provádí při 340 nm.

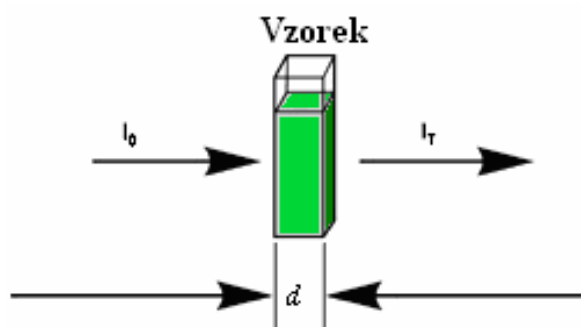
Metodou se měří počáteční a celková aktivita Rubisco. Poměr mezi počáteční aktivitou a celkovou aktivitou udává rozsah karbamylace. Počáteční aktivita se měří ihned po extrakci,

zatímco celková aktivita se měří až po inkubaci Rubisco se saturačními koncentracemi CO_2 a Mg^{2+} . Pojmenování celková aktivita může být poněkud matoucí, protože při inkubaci s CO_2 a Mg^{2+} nejsou odstraněny veškeré inhibitory z vazebných míst. Aktivita, při které jsou z vazebných míst odstraněny veškeré inhibitory, se nazývá aktivitou maximální. Odstranění inhibitorů lze dosáhnout při inkubaci s SO_4^{2-} ionty. [27]

Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu patří mezi nejčastěji používané metody pro stanovení katalytické aktivity enzymů. Podstatou metody je absorpce viditelného nebo ultrafialového záření molekulami vzorku. Změna absorbance je přímo úměrná změně koncentrace substrátu za stejný časový interval, samozřejmě za předpokladu, že platí Lambertův-Beerův zákon:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot d$$

kde A je absorbance, t je změna času v (s), c je koncentrace (mol.l^{-1}), ε je molární absorpční koeficient ($\text{cm}^2.\text{mmol}^{-1}$) a d je tloušťka absorbující vrstvy (cm).



Obr. 10 Průchod zářením vzorkem [28]

Při průchodu toku záření se ztrácí odražené, rozptýlené a absorbované záření. Odraz a rozptyl záření se zanedbává, protože jsou to nepatrné úbytky. Významným úbytkem je záření absorbované vzorkem a záření, které projde vzorkem. [5], [29], [30]

Úbytek nebo přírůstek absorbance je možné měřit bodově. Při bodovém měření jsou hodnoty odečítány ve stanovených časových intervalech. Často jsou časové intervaly stanoveny na 30 s nebo 60 s. Celkový čas měření se pohybuje mezi 3 až 5 minutami. Pokud se jedná o pomalou reakci, mohou být intervaly odečtu i celkový čas měření delší.

Spektrometr může být buď jedno-paprskový, nebo dvou-paprskový. U jedno-paprskových měření se musí začít nastavením na nulovou koncentraci, což se provede pomocí blanku (slepého vzorku), u kterého se nastaví nulová koncentrace. Poté je již možné měřit vzorky. Výhodou dvou-paprskového spektrometru je, že dovoluje měřit najednou blank i vzorek. Dochází k rovnoměrnému dělení paprsku v časových intervalech a k průběžnému porovnávání mezi blankem a vzorkem. [29], [30]

2.4.3. Radiometrické stanovení enzymu Rubisco

Při použití radiometrického stanovení je nutné pracovat v prostředí bez přítomnosti CO_2 a uhličitánů. Do takto upravené směsi se přidá přesně definované množství ^{14}C ve formě NaHCO_3 . Reakce začne, po přidání určeného množství RuBP nebo aktivovaného extraktu enzymu. Reakce se zastaví po přidání kyseliny chlorovodíkové, která současně uvolní

ze směsi nadbytečný značený hydrogenuhličitan jako $^{14}\text{CO}_2$. Následně se může změřit radioaktivita produktů. Naměřená radioaktivita se shoduje s množstvím asimilovaného $^{14}\text{CO}_2$. [31]

2.5. Metody stanovení obsahu Rubisco

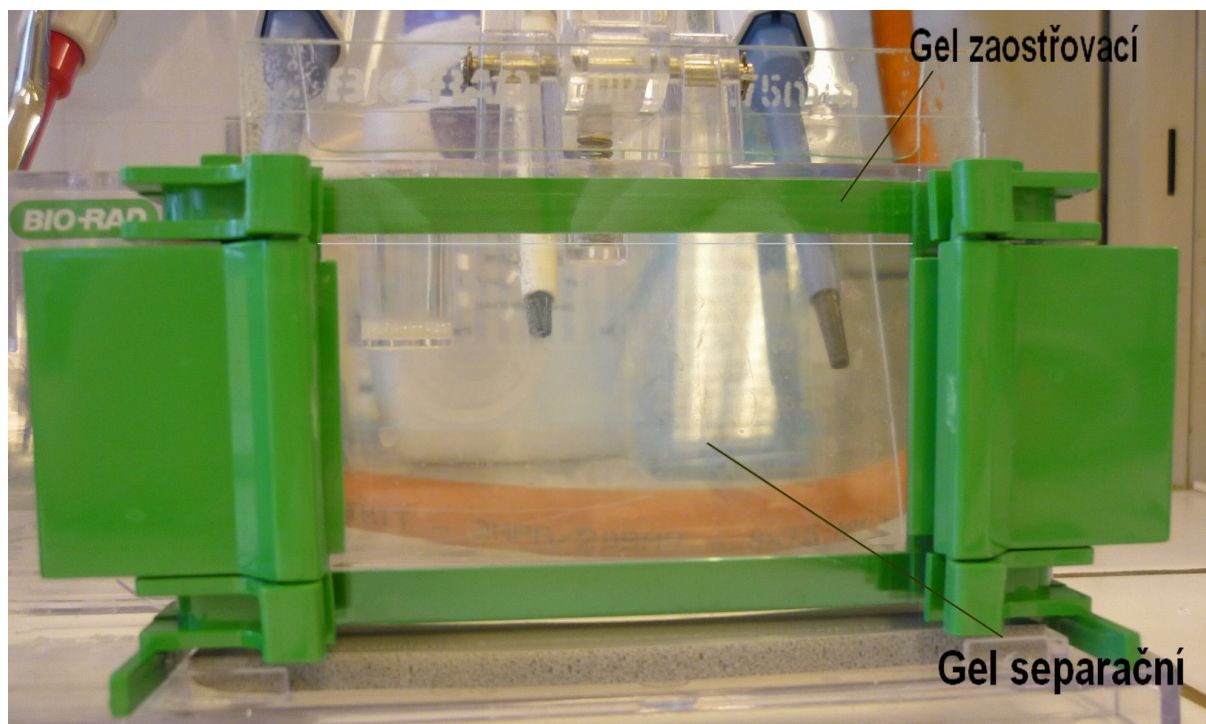
2.5.1. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří mezi nejpoužívanější techniky pro dělení makromolekul. K separaci se používají porézní gely (např.: polyakrylamidový gel nebo agarosa), který umožňují separaci molekul na principu molekulárního síta a také na základě elektroforetické pohyblivosti. K separaci vzorků dochází ve stejnosměrném proudu, který prochází mezi katodou a anodou. Uspořádání elektroforézy může být dvou typů a to buď v trubičkách, nebo v plošném uspořádání. Plošně uspořádaná elektroforéza se dále může provádět ve vertikální nebo horizontální poloze. Pro stanovení množství Rubisco bylo v této práci použito plošné uspořádání ve vertikální poloze. [32], [33]

Plošné uspořádání má vůči trubičkovému řadu výhod, např. na jednom gelu může být více vzorků, je citlivější a lze denzitometricky¹ kvantifikovat. Nevýhodou plošného uspořádání je jeho vyšší náročnost. [32], [33]

Pro dosažení dostatečného elektroforetického rozlišení bylo nutné zavést diskontinuální elektroforézu, ve které jsou využívány dva typy gelů (zaostřovací a separační). Zaostřovací gel obsahuje velké póry a pH jeho pufru je přibližně o dvě jednotky nižší (pH 6,8). Na rozdíl od gelu separačního, který je pod gelem zaostřovacím, obsahuje póry drobnější a pH použitého pufru je okolo (9,2). V zaostřovacím gelu, se zóny vzorku (bílkovin) seřadí podle svých elektroforetických pohyblivostí. Seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí a dochází tak ke vzniku ostře ohraničených zón iontů. Projevuje se zde i tzv. samozaostřující efekt. To znamená, dojde-li ke zpoždění některého iontu od jeho zóny, dostane se do prostředí s vyšší hodnotou potenciálu, což způsobí jeho okamžité urychlení a návrat do jeho zóny (při předbíhání je to naopak). Při vstupu do separačního gelu dochází k rozdělení zón od sebe, na základě jejich náboje a velikosti molekul. [32], [33]

¹ Měření optických hustot zpracovaných fotografických záznamů.



Obr. 11 Nanosená gely v aparatuře

Technika používaná výhradně pro stanovení množství proteinů je elektroforéza SDS-PAGE. Separace probíhá v závislosti na velikosti molekul a hustoty gelu. Po přidání dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na proteiny v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu, získají proteiny shodný záporný náboj. Proteiny se poté separují pouze podle své velikosti a hustoty gelu. Využívá se zde pohyblivosti nabitých částic v elektrickém poli a jejich odlišné pohyblivosti v gelu. Elektroforetická migrace proteinů obalených SDS je dána volnou pohyblivostí. [34], [35]

2.5.2. Kapilární elektroforéza

Technika je založena na odlišné elektroforetické mobilitě látek při vysokém napětí (10-30 kV). Vzorek je umístěn v křehké křemíkové kapiláře, která má nepatrný průměr 10-100 μm , ale její délka se pohybuje mezi 10 až 100 cm. Díky těmto rozměrům nedochází k promísení separovaných částic difuzí. Na částice má vliv i elektroosmotický tok, který rozhoduje o směru pohybu částic v kapiláře.

Kapilára je naplněná elektrolytem a její konce jsou ponořeny do zásobníku s elektrolytem. Pro detekci se používají detektory např.: UV detektor, dioda pólový detektor nebo laserový IF detektor. [30], [36], [37]

Kapilární elektroforéza byla použita ke stanovení obsahu Rubisco Warrenem [38]. Připravený vzorek byl rozdělen pomocí kapiláry pokryté SDS. Jako separační pufr byl použit gel SDS 14–200. Pro zkrácení času analýzy, byl vzorek vstříknut výstupní stranou. Elektroforéza probíhala při 20 °C, konstantním napětí 9kV a 0,5 psi tlaku aplikovaném na konci kapiláry. Rubisco bylo detekováno při 220nm. [38]

2.5.2.1. *HPLC*

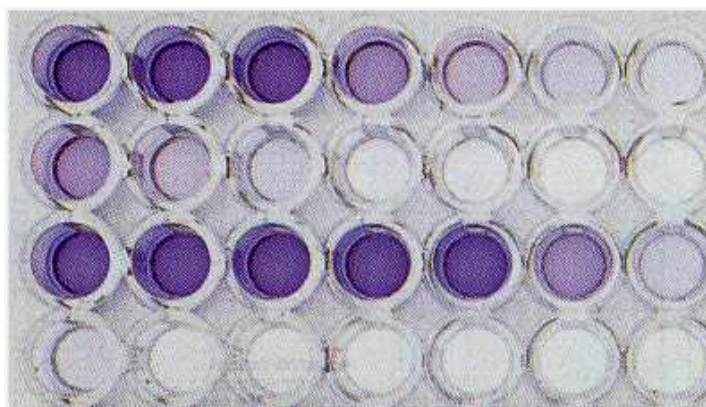
HPLC není příliš používaná pro stanovení množství Rubisco. Při jeho stanovení se nejčastěji používá gelová kolona, kterou nejrychleji procházejí velké molekuly a naopak malé molekuly jsou v ní dlouho zadržovány. Metoda gelové chromatografie, byla použita v práci Antonova [39] a také v práci Shena [40]. [41]

2.5.3. **Imunologické metody**

2.5.3.1. *ELISA*

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je jedna ze základních metod imunologie. Metodu je možné použít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní měření. Zjišťuje se vazba protilátky a antigenu, přitom jedna ze složek je vázaná kovalentně na enzym. Enzym katalyzuje přechod přidaného chromogenního substrátu na barevný produkt. Čím je barva sytější, tím je vyšší koncentrace antigenu nebo protilátky ve vzorku. ELISA se vyhodnocuje spektrofotometricky. Její výhodou je vysoká specifita a citlivost. [42], [43]

Metoda byla použita Nassourym [44] pro stanovení množství Rubisco. Protilátky byly připraveny v králíkovi. Antigen Rubisco byl připraven jako označený His s inzercí cDNA kódující Rubisco. Následně byla připravená DNA vložena do vektoru pQE31. Orientace vektoru byla ověřena polymerázovou řetězovou reakcí a restrikčním mapováním. Vektor byl vložen do buněk M15, které byly přečištěny pomocí afinitní chromatografie. Rubisco bylo kvantifikováno po reakci s anti-Rubisco protilátkou, sekundární značenou protilátkou peroxidasou a chromogenním substrátem. Stanovení bylo provedeno fotometricky při 650 nm. [41], [44]



Obr. 12 ELISA: ukázka rozdílů intenzity zabarvení v závislosti na koncentraci antigenu nebo protilátky [42]

2.5.3.2. *Singl radialní imunodifuzní metoda*

Imunologická metoda (single radial immunodiffusion methods) byla použita pro zjištění množství Rubisco Wangem et al.[45]. Při pokusu bylo použito králíčí sérum protilátek a standard Rubisco, získané z listů rýže. Podle práce Sugiyama [46] byl enzym přečištěn, modifikován, následně zředěn a umístěn na gelové plotny. Plotny obsahovaly známé množství králíčího antigenu (IgG). Takto připravené vzorky byly následně inkubovány po dobu 50

až 70 hodin při teplotě 25°C. Během inkubace proběhla v gelu radiální difuze. Po jejím ukončení byly gely usušeny a obarveny pomocí Coomassie Brilliant blue. Vysrážené plochy kruhů sraženin byly změřeny. Velikost kruhu byla úměrná koncentraci zjišťovaného proteinu. [45]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

V experimentální části byl zjišťován denní chod aktivity a obsahu enzymu Rubisco v listech špenátu setého (*Spinacia oleracea* [L.]) pěstovaného v polních podmínkách. Vzorky listů byly odebrány v časových intervalech dvou hodin, přičemž začátek měření byl před rozedněním ve 4 hodiny ráno a konec 45 minut po setmění ve 22 hodin. Při odběrech bylo odebráno dvacet disků špenátu. Deset bylo použito na stanovení aktivity enzymu a zbylých deset bylo použito na zjištění obsahu enzymu Rubisco. Odběr vzorků probíhal ve dvou dnech, které se od sebe extrémně lišily úrovní fotosynteticky aktivní radiace (FAR). První den odběrů (20. 5. 2008) bylo zataženo s vytrvalým deštěm a FAR se většinu dne pohybovala pouze mezi 180–240 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Druhý odběr se uskutečnil 30. 5. 2008, kdy bylo slunečné počasí a zcela beze srážek. Hodnoty FAR byly většinu dne vyšší než 700 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, přičemž maximum (1600 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) bylo naměřeno ve 12:00 hodin.

Z čerstvě utrženého listu byly vyříznuty dva disky o přesně daném rozměru pomocí korkovrtu. Tyto disky byly následně vloženy do označené mikrozkušavky Eppendorf. Takto připravený vzorek byl vložen do termosky s tekutým dusíkem. Po ukončení odběrů byly vzorky uchovávány při teplotě asi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy.



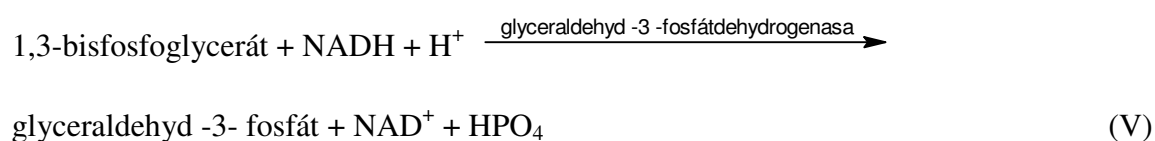
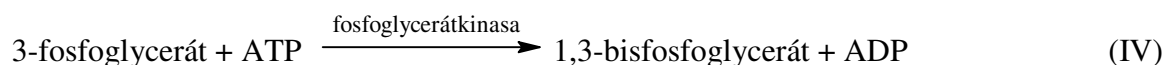
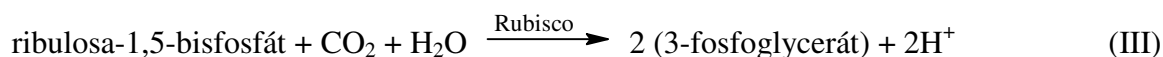
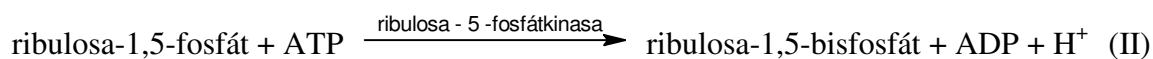
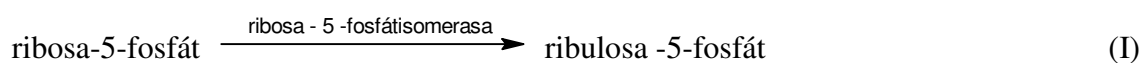
Obr. 13 Rostliny špenátu zelného (*Spinacia* (*Spinacia oleracea* [L.] [47]

3.2. Metody

3.2.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco

Pro stanovení aktivity enzymu Rubisco byl, v této práci, zvolen interval 30 s po celkový čas 420 s (7 min.).

Spektrometrické stanovení aktivity enzymu Rubisco vycházelo z metody Lilleyho a Walkera [48] s extrakcí podle Besforda [49]. Tento postup stanovení aktivity Rubisco je založen na sprzęžení prvních tří reakcí Calvinova cyklu (reakce III, IV, V)



Jako substrát byl použit ribosa-5-fosfát, který se v reakční směsi přeměňuje na ribulosa-1,5-bisfosfát enzymy obsaženými v extraktu (reakce I, II). KHCO_3 , který uvolňuje CO_2 , byl do směsi přidán jako druhý substrát reakce. K aktivaci Rubisco byly rovněž přidány ionty Mg^{2+} ve formě MgCl_2 . Do reakce byly rovněž přidány enzymy potřebné pro katalýzu reakcí (III-V), NADPH a ATP. Konečným produktem je glyceraldehyd-3-fosfát (reakce III-V). Pro zabránění hromadění ADP, který inhibuje enzym fosfoglycerátkinázu, je ATP fosforylováno v reakci (VI). Aktivita Rubisco byla vypočítána z úbytku absorbance při oxidaci NADH (reakce V) podle Lambertova-Beerova zákona. Počáteční aktivita byla stanovena podle Heringové. [31]

3.2.1.1. *Přístroje*

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® CZ Hradec Králové. Parametry: maximální vážená hmotnost 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.
- pH metr KNICK Portamess, typ 913 pH
- Centrifuga MLW T52.1
- Absorpční spektrofotometr Helios γ od firmy SPECTRONIC UNICAM. Rozsah pro měření je od 190 nm do 1100 nm, spektrální šířka pásu 2 nm.

3.2.1.2. *Chemikálie*

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina; Sigma ALDRICH
 Na_2EDTA – ethylendiamintetraoctan disodný; Sigma ALDRICH
 KOH – hydroxid draselný; Penta
 DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH
 MgCl_2 – chlorid hořečnatý; Sigma ALDRICH
 BSA – hovězí sérový albumin; Sigma ALDRICH
 KHCO_3 – hydrogenuhličitan draselný; Sigma ALDRICH

Kreatinfosfokinasa; Sigma ALDRICH
R5P – ribulosa-5-fosfát; Sigma ALDRICH
3-Fosfoglycerátkinasa; Sigma ALDRICH
ATP – adenosin-5'-trifosfát; Sigma ALDRICH
NADH – β -nikotinamidadenindinukleotid; Sigma ALDRICH
Fosfokreatin; Sigma ALDRICH

3.2.1.3. *Příprava roztoků*

Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8

Přibližně v 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a poté 0,372 g Na₂EDTA. Po jejich rozpuštění bylo upraveno pH roztoku na konečnou hodnotu 7,8 pomocí roztoku KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$). Následně byl roztok převeden do 1000 ml odměrné baňky a byl doplněn až po rysku. Roztok byl stabilní a bylo ho možné skladovat při laboratorní teplotě

Příprava zásobního roztoku 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0

Přibližně v 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 11,92 g HEPES a poté 0,438 g Na₂EDTA. Po jejich rozpuštění bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 8,0 pomocí roztoku KOH ($c = 3 \text{ mol l}^{-1}$). Následně byl roztok převeden do 1000 ml odměrné baňky a doplněn až po rysku. Roztok byl stabilní a bylo ho možné uchovávat při laboratorní teplotě.

Příprava aktivačních roztoků

0,2285 g MgCl₂ bylo rozpuštěno v 50 ml v HEPES-KOH, pH 8,0.

0,3003 g KHCO₃ bylo rozpuštěno v odměrné baňce 50 ml v HEPES-KOH, pH 8,0. Roztoky byly stabilní a bylo je možno uchovávat při laboratorní teplotě.

Příprava extrakčního roztoku

Ve 200ml HEPES-KOH, pH 7,8, bylo rozpuštěno 0,156 g DTT, 0,096 g MgCl₂ a 0,4 g BSA. Roztok byl stabilní, a bylo jej možno uchovávat při laboratorní teplotě. Připravený roztok obsahoval 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ a 0,2% BSA.

Příprava roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

6 mg enzymu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy bylo rozpuštěno v 1ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0. Roztok byl skladován při teplotě -18°C.

Příprava roztoku kreatinfosfokinasy

2 mg enzymu kreatinfosfokinasy bylo rozpuštěno v 1 ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0. Roztok byl dle požadavků na stabilitu skladován při teplotě -18°C.

Příprava roztoku R5P

V 1ml zásobního roztoku HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno 6,2 mg R5P. Roztok bylo nutné uchovávat při teplotě -18°C.

Příprava roztoku 3-fosfoglycerátkinasy

Roztok, použitý pro měření, byl komerčně dodávaný. Dle požadavků výrobce byl skladován při teplotě 4°C.

Příprava pracovního roztoku

V 10 ml HEPES-KOH, pH 8,0 bylo rozpuštěno:

- 0,002 g NADH
- 0,008 g DTT
- 0,013 g fosfokreatinu
- 0,019 g ATP
- 19 µl 3-fosfoglycerátkinasy
- 100µl roztoku kreatinfosfokinasy
- 100µl roztoku glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy

Roztok obsahoval 50 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 1 mM Na₂EDTA, 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 5 mM fosfokreatinu, 3,5 mM ATP, 80 nkat glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy.

Roztok je stálý maximálně 6 hodin a uchovával se při laboratorní teplotě.

3.2.1.4. Extrakce enzymů

Vzorek špenátu byl rozdrcen s mořským pískem ve třecí misce, poté bylo přidáno 5 ml extrakčního roztoku. Přibližně po půl minutě homogenizace byl roztok přelit do centrifugační zkumavky a odstředován v centrifuze po dobu 1 minuty. Extrakt byl použit pro stanovení počáteční a celkové aktivity enzymu. Vzhledem k nestálosti a rychlému stárnutí extraktu bylo nezbytné pracovat co možná nejrychleji.



Obr. 14 Extrakt ze špenátových listů po centrifugaci

3.2.1.5. Měření aktivity Rubisco

Měření počáteční aktivity

Do kyvety bylo napipetováno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a aktivačního roztoku KHCO_3 . Poté bylo přidáno 20 μl špenátového extraktu, 850 μl pracovního roztoku a 30 μl R5P. Vzorek byl dobře promíchán a okamžitě byl měřen pokles absorbance při 340 nm ve 30s intervalech.

Měření celkové aktivity

Do kyvety bylo napipetováno 50 μl aktivačního roztoku MgCl_2 a aktivačního roztoku KHCO_3 . Poté bylo přidáno 20 μl špenátového extraktu. Roztok byl následně promíchán a inkubován po dobu 15 minut. Po uplynutí této doby bylo přidáno 850 μl pracovního roztoku a 30 μl R5P. Vzorek byl dobře promíchán a okamžitě byl měřen pokles absorbance při 340 nm ve 30s intervalech.

3.2.1.6. Výpočet aktivity enzymu Rubisco

Z naměřených hodnot absorbance byl vypočítán její úbytek za 30 s (ΔA). Z těchto změn absorbance byla pak pomocí Lambert-Beerova zákona vypočítána aktivita enzymu.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{\Delta c}{\Delta t} \cdot \varepsilon \cdot l$$

Přičemž ΔA je změna absorbance, t je změna času v [s], c je koncentrace [mol^{-1}], ε je molární absorpční koeficient [$\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$] a l je délka optické dráhy [cm].

Aktivita enzymu byla vypočítána z rychlosti úbytku substrátu (CO_2).

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A \cdot V}{2 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

Hodnota ε představuje pro NADH $6300 \text{ cm}^2 \text{mmol}^{-1}$, l je optická dráha kyvety o velikosti 1 cm.

▪ Příklad výpočtu aktivity enzymu Rubisco

Výpočet počáteční i celkové aktivity je shodný. Naměřené hodnoty se od sebe liší tím, že počáteční aktivita má vyšší hodnoty absorbance, ale jejich rozdíl je nižší, než je tomu u celkové aktivity. Aktivita byla měřena v časovém intervalu od 0 s do 420 s, přičemž počáteční a konečné hodnoty musely být často vyřazeny, protože tyto krajní hodnoty nevykazovaly linearitu.

Tab. 1 Naměřené hodnoty počáteční aktivity ve vzorku špenátových listů odebraných ve 20:00 hodin 30. 5. 2008 sluneční den.

t [s]	plocha [m^2]	A	ΔA
0	0,000628	0,799	
30	0,000628	0,845	0,003
60	0,000628	0,842	0,004
90	0,000628	0,838	0,003
120	0,000628	0,835	0,004
150	0,000628	0,831	0,003
180	0,000628	0,828	0,003
210	0,000628	0,825	0,003
240	0,000628	0,822	
270	0,000628	0,817	0,003
300	0,000628	0,814	0,003
330	0,000628	0,811	0,003
360	0,000628	0,808	0,003
390	0,000628	0,805	0,003
420	0,000628	0,799	
Průměr ΔA [s^{-1}]			0,0032

Úbytek absorbance byl měřen po 30 s, proto je nutné jej vynásobit dvěma. Výpočet aktivity:

$$\Delta n = \frac{2 \cdot \Delta A [\text{min}^{-1}] \cdot V [\text{cm}^3]}{2 \cdot \varepsilon [\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}] \cdot l [\text{cm}]} = \frac{2 \cdot 0,0032 \cdot 1}{2 \cdot 6300 \cdot 1} = 5,026 \cdot 10^{-7} \text{ mmol CO}_2 \text{ min}^{-1}$$

Převedení na sekundy

$$\Delta n = \frac{5,026 \cdot 10^{-7} \cdot 1000}{60} = 8,377 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Přepočet na 5 ml extraktu:

$$\Delta n = \frac{5 \cdot 8,377 \cdot 10^{-6}}{0,02} = 2,094 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$$

Aktivita Rubisco vztažená na plochu disků ($S = 0,000628 \text{ m}^2$):

$$\Delta n = \frac{1 \cdot 2,094 \cdot 10^{-3}}{0,000628} = 3,334 \mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$$

- Výpočet stupně aktivace:

Stupeň aktivace se vypočítá, jakožto poměr počáteční a celkové aktivity.

$$\text{Stupeň aktivace} = \frac{A_{\text{počáteční}}}{A_{\text{celková}}} \cdot 100 = \frac{3,495}{4,059} \cdot 100 = 86,09\%$$

3.2.1.7. Přístroje

- Analytické váhy HR-120-EC od firmy HELAGO® CZ Hradec Králové.
Parametry: maximální vážená hmotnost 120 g, nejmenší dílek 0,1 mg, atest ČMI.
- pH metr KNICK Portamess, typ 913 pH
- Centrifuga MLW T52.1
- Vertex-stuart firmy MERCI s.r.o.
- Termoblok TDB-100 od firmy BIOSAN
- Mini-PROTEAN 3 aparatura pro elektroforézu od firmy Bio-RAD
- Zdroj Power Pac 300 od Bio-RAD
- Třepačka LT2

3.2.1.8. Chemikálie

Akrylamid; SERVA

N,N'-methylenbisakrylamid; SERVA

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma ALDRICH

HCl – kyselina chlorovodíková; Penta

SDS – dodecylsulfát sodný; Sigma ALDRICH

Peroxodisíran amonný; SERVA

Bromfenolová modř Na sůl; SERVA

TEMET-N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin; SERVA

Glycin; SERVA
DTT – dithiothreitol; Sigma ALDRICH
Glycerol; Sigma ALDRICH
2-merkaptoethanol; Sigma ALDRICH
Methanol; Penta
Brilantní modř G 250 – Coomassie; SERVA
CH₃COOH-kyselina octová; LACH-NER
Butanol; LACH-NER
Ethanol; Lachema
standard Rubisco; D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa izolovaná ze špenátu; Sigma ALDRICH

3.2.1.9. *Příprava roztoků*

Roztoky pro přípravu gelů

▪ **Roztok A**

30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml. Roztok je uchováván při teplotě 4°C.

Roztok B

18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, poté bylo upraveno pH koncentrovanou HCl na hodnotu pH 8,8. Roztok byl doplněn na 100 ml a uchováván stejně jako roztok A při teplotě okolo 4°C.

Roztok C

18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, poté bylo upraveno pH koncentrovanou HCl na hodnotu pH 6,8. Roztok byl doplněn na 100 ml a uchováván také při teplotě okolo 4°C.

Roztok D

Ve 100ml vody bylo rozpuštěno 10 g SDS. Roztok byl skladován při laboratorní teplotě, ale bylo nutné uchovávat roztok ve tmě.

Roztok E

V 1 ml vody byl rozpuštěn 0,1 g peroxodisíran amonný. Roztok bylo nutné připravovat nový a to pro každé jednotlivé stanovení množství proteinů.

Roztok F

V 1 ml vody bylo rozpuštěno 0,01 g bromfenolové modři. Roztok bylo nutné uchovávat v chladničce při teplotě okolo 4°C.

TEMED

Komerčně dodávaný roztok

Roztoky pufrů

- **TRIS pufr**

Ve 450 ml vody bylo rozpuštěno 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a nakonec bylo přidáno 50 ml glycerolu. Po rozpuštění všech látek bylo upraveno pH roztoků, za použití koncentrované HCl na hodnotu pH 6,8. Roztok bylo možno uchovávat při laboratorní teplotě.

- **Vzorkovací pufr**

Obsahuje 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkptoethanolu. Roztok se uchovával při teplotě 4°C, pokud možno zakryty, neboť přidaný merkptoethanol velmi zapáchá.

- **Elektrodový pufr**

V 1000 ml vody bylo rozpuštěno 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu. Roztok nebylo nutné připravovat pro každou elektroforézu nový a mohl se používat opakovaně. Skladoval se v chladničce při teplotě okolo 4°C.

Roztoky pro vizualizaci bílkovin

- **Stabilizační roztok**

Stabilizační roztok byl vytvořen smícháním 100 ml methanolu a 400 ml vody.

- **Barvicí roztok**

Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

- **Odbarvovací roztok**

Na přípravu odbarvovacího roztoku se použilo 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.2.1.10. Příprava standardů

Ze standardu Rubisco (D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa) byla připravena řada standardů o stoupající koncentraci. V mikrozkuhavce Eppendorf bylo rozpuštěno 1mg/ml D-ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasy v 1 ml vzorkového pufru. Roztok byl promíchán na vortexu a 5 minut vařen v termobloku při teplotě 100 °C. Po ochladnutí se standardy uchovávaly v mrazničce při teplotě -18 °C. Z tohoto základního standardu pak byla pomocí ředění připravena řada standardů, jak je naznačeno v (Tab. 2).

Tab. 2 Objemy vody a standardu pro vytvoření kalibrační řady

V _{standardu} [ml]	V _{vody} [ml]	c [mg/ml]
0,8	0,2	0,8
0,6	0,4	0,6
0,4	0,6	0,4
0,2	0,8	0,2

Příprava vzorků probíhala obdobným způsobem, jako příprava standardů.

3.2.1.11. Příprava vzorků pro stanovení SDS-PAGE

Dva disky špenátu byly rozdrčeny pomocí mořského písku v třecí misce. Poté byl přidán 1 ml TRIS pufru. Vzorek byl ještě přibližně 15 s homogenizován a následně byl převeden do centrifugační zkumavky a 60 s odstředován, aby mořský písek a nečistoty klesly ke dnu a bylo možno napipetovat čistý extrakt. Po ukončení centrifugace bylo do mikrozukavky Ependorf napipetováno 0,5 ml špenátového extraktu a 0,5 ml vzorkovacího pufru. Takto připravený vzorek byl promíchán na Vertexu, poté byl 5 minut vařen v termobloku při teplotě 100 °C a následně se vzorek nechal zchladnout. Připravené vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu.

3.2.1.12. Příprava gelů

Skleněné nádoby byly očištěny vodou a odmašťovacím prostředkem, poté opláchnuty destilovanou vodou a nakonec vyleštěny buničinovou vatou namočenou v ethanolu. Skla byla vložena a upevněna ve stojánek tak, aby bylo vzadu sklo silné a vpředu sklo slabé. Stojánek byl vložen do držáčku a silně zatlačen do podložky, která byla pečlivě očištěna. Tímto se zamezilo vytečení gelu. Pro stanovení množství enzymu byl používán 10% separační a 5% zaostřovací gel.

Příprava separačního gelu

Do 50 ml kádinky byly napipetovány sloučeniny podle následující tabulky (Tab. 3):

Tab. 3 Objemy přidávaných roztoků použitých pro přípravu separačního gelu

Přidávaná složka	Objem [ml]
Destilovaná voda	4,0
Roztok A	3,3
Roztok B	2,5
Roztok D	0,1
Roztok E	0,14
TEMED	0,004

Roztoky E a TEMED byly přidávány až nakonec, těsně před nalitím mezi skla. Gel byl zamíchán a nalit mezi skla do výšky 2 cm od horního konce tenčího skla a to proto, aby bylo

možno nalít ještě gel zaostřovací. Připravený separační gel byl zalit butanolem, aby se vyrovnala hladina a také nedocházelo k jeho vysychání.

Příprava zaostřovacího gelu

Do 50 ml byly napipetovány sloučeniny podle následující tabulky (Tab. 4):

Tab. 4 Objemy přidávaných látek pro přípravu zaostřovacího gelu

Přidávaná složka	Objem [ml]
Destilovaná voda	2,1
Roztok A	1,0
Roztok C	0,38
Roztok D	0,03
Roztok E	0,03
TEMED	0,003

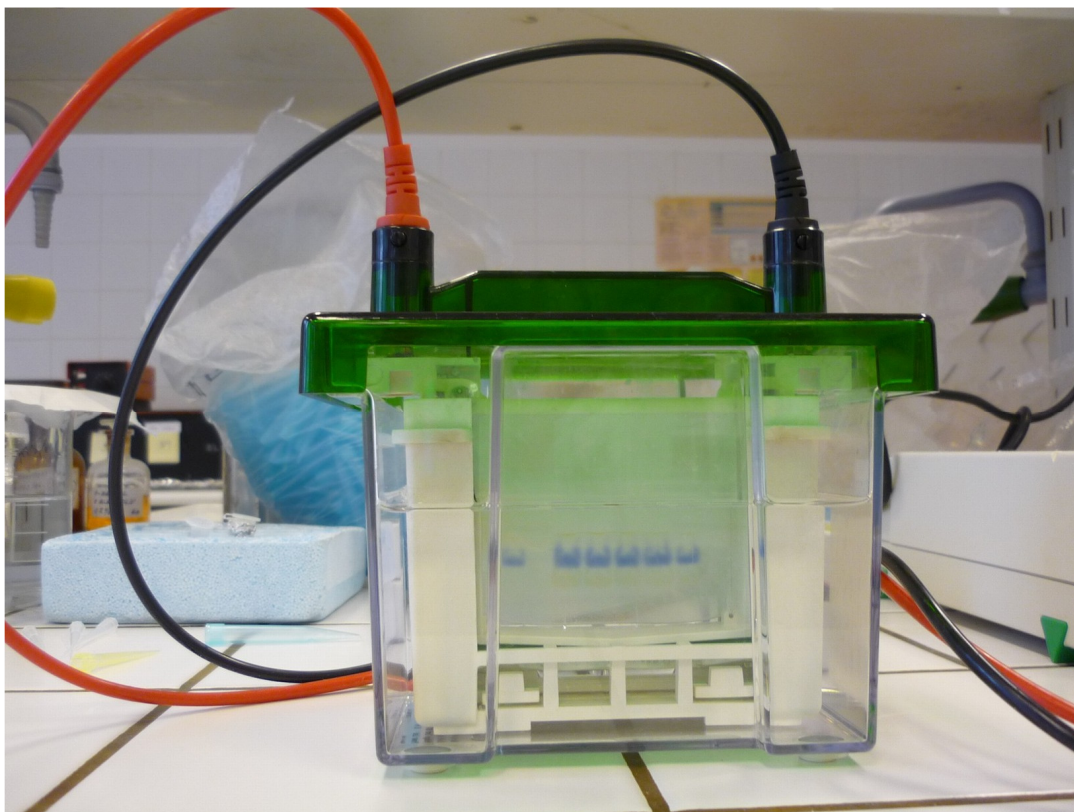
Ze separačního gelu byl slit butanol a gel byl promyt destilovanou vodou. Roztoky E a TEMED byly opět přidávány až před samotným nalitím mezi skla. Gel byl zamíchán a nalit mezi skla. Do gelu byl poté rychle vložen hřebínek, aby gel nestačil ztuhnout a tím nedošlo ke špatnému vytvoření komůrek. Hřebínek byl z gelu vyjmut až před samotným napipetováním vzorků.

Gel bylo možno připravit jeden den dopředu, ale bylo ho potřebné uchovat v chladničce.

3.2.1.13. Elektroforéza

Ze ztuhlého gelu byl rovnoměrně vytažen hřebínek a desky byly uvolněny ze stojánku. Skla byla očištěna od zbytků gelu a vložena do stojánku na elektroforézu, tenkým sklem dovnitř a upevněna. Poté byl, do vnitřního prostoru mezi desky skel, nalit elektroforetický pufr. Pokud neprotékal, byl stojánek vložen do elektroforetické nádoby a i sem byl, přibližně do poloviny nádoby, nalit elektrodotový pufr.

Do jamek byl, pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou, napipetován standard a vzorky. První jamka byla vynechána, do druhé bylo napipetováno 10 μ l standardu, následující jamka byla opět vynechána a do dalších již byly napipetovány vzorky. Objem vzorků byl 10 μ l. Poté mohla být elektroforéza připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí, které bylo nastaveno na konstantních 140 V. V průběhu elektroforézy bylo nutné sledovat, zda elektrodotový pufr nevytéká z vnitřního prostoru aparatury a popřípadě pufr doplnit. Dále byla sledována poloha modrého barviva, aby vzorek tzv. neutekl. Elektroforéza probíhala, dokud čelo vzorku nebylo asi 1–2 cm od spodního okraje gelu, což trvalo přibližně 60 až 120 minut.



Obr. 15 Probíhající SDS-PAGE elektroforéza

3.2.1.14. Vizualizace bílkovin

Po ukončení elektroforézy byl elektroforetický pufr slit a desky byly vloženy do misek s destilovanou vodou tenkým sklem dolů. Pomocí špachtle byla skla od sebe opatrně oddělena a vyjmuta. Destilovaná voda byla poté slita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem. Stabilizační roztok a misky s gely byly položeny na třepačku a jemně třepány. Stabilizace trvala 5 minut, po uplynutí této doby byl roztok slit a na gel byl nalit roztok barvicí. Barvení gelu trvalo 30 minut a opět bylo prováděno za použití třepačky. Po obarvení byl roztok slit a gel byl odbarvován. Nejprve byl do misek nalit již použitý odbarvovací roztok, který z misek odstranil zbytky usazené barvy. Po jejich odstranění byly gely převrstveny již čistým odbarvovacím roztokem. Gely byly odbarvovány po dobu 90 minut. Poté byl roztok slit a gely byly promyty destilovanou vodou. Následně byly gely vloženy na tenké sklo, zabaleny do potravinářské folie a uloženy do chladničky a skladovány při teplotě okolo 8 °C. Při této teplotě nedochází k příliš rychlému vysychání gelů a následně i k jejich poškození při vyhodnocování.

3.2.1.15. Vyhodnocení gelů

Vyhodnocení gelů se provádělo naskenováním gelů. Kvantifikace velké podjednotky byla provedena pomocí programu Multi Gauge ver3.X, FUJIFILM. Zóny velkých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Plocha píku vzorku, se ve výpočtu vztáhla na plochu píku standardu. Aby se předešlo nepřesnostem v měření, nanášel se standard na každý gel.

▪ **Příklad výpočtu množství enzymu Rubisco**

Pro stanovení byl použit standard o koncentraci Rubisco 1 mg/ml. Prvním krokem ve výpočtu byl výpočet koncentrace vztažená na standard, pomocí trojčlenky a pak přepočet na neředěný vzorek, celkový objem extraktu a následně na plochu disku použitého při analýze.

Tab. 5 Ukázka výpočtu množství Rubisco v listu špenátu odebraným ve 14:00 20.5.2008

Odběr ve 14:00 20.5.2008				
vzorek	plocha zóny	plocha disku [m ²]	c [mg/ml]	c [g m ⁻²]
1	143,0	0,000628	1,44	4,58
2	153,0		1,53	4,90
3	153,0		1,53	4,90
4	143,0		1,44	4,58
5	148,0		1,48	4,74
standard	199,0			
průměr				4,74

Výpočet koncentrace Rubisco ve dvakrát zředěného vzorku (0,5 ml extraktu s 0,5 ml vzorkového pufru)

$$199,0 \dots\dots\dots 1 \text{ mg / ml}$$

$$143,0 \dots\dots\dots x \text{ mg / ml}$$

$$x = \frac{1 \cdot 143,0}{199,0} = 0,72 \text{ mg / ml}$$

Koncentrace Rubisco v neředěném vzorku

$$c = 0,72 \cdot 2 = 1,44 \text{ mg / ml}$$

Hmotnost Rubisco ve 2 ml extraktu.

$$m = 1,44 \cdot 2 = 2,87 \text{ mg}$$

Přepočet na plochu 1m²

$$c = \frac{2,87}{1000 \cdot 0,000628} = 4,58 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$$

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

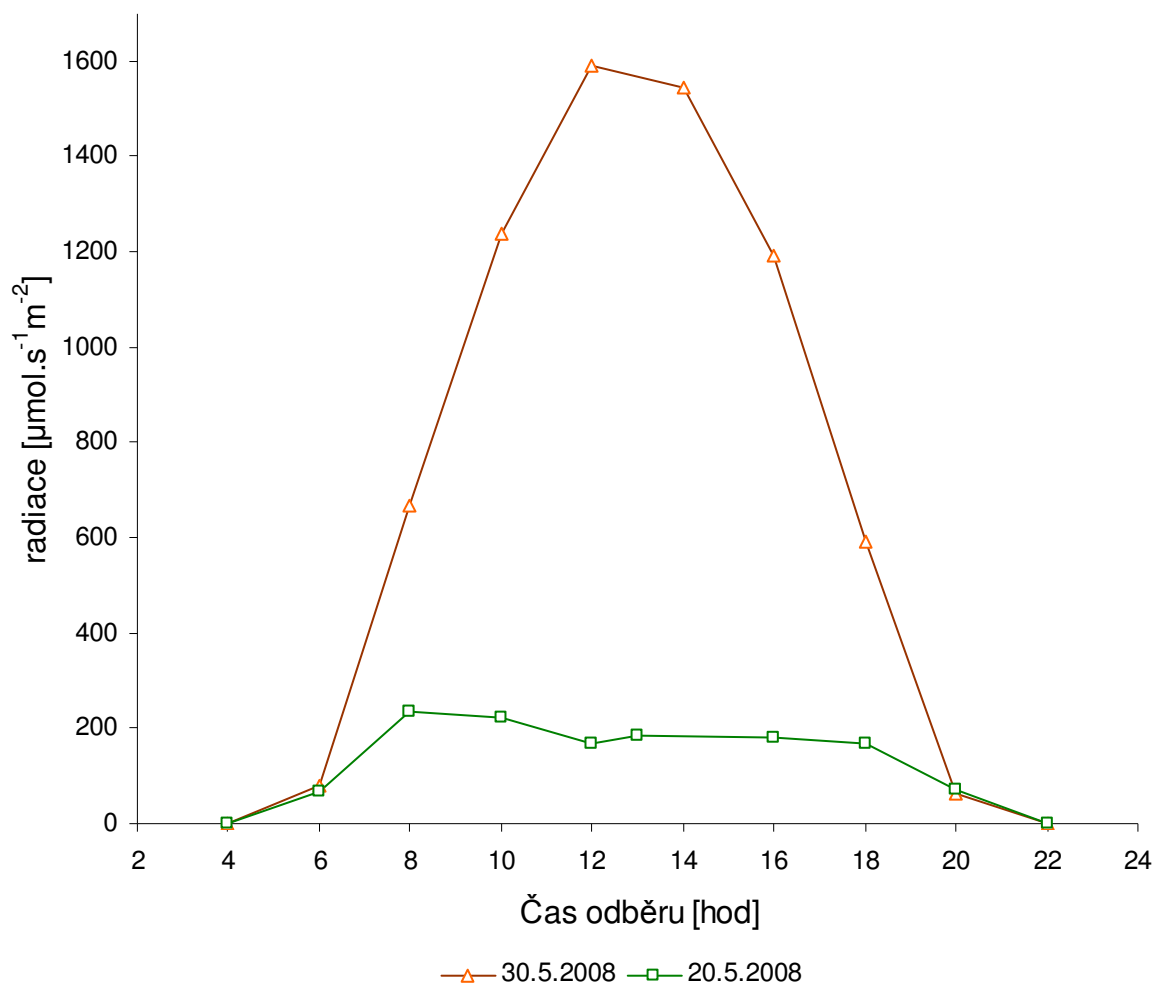
4.1. Výsledky

Tab. 6 Změna intenzity ozáření v průběhu zataženého dne ($n = 5$)

Intenzita radiace v průběhu dne 20. 5. 2008	
čas [hod]	radiace [$\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$]
4:00	0,00
6:00	65,60
8:00	236,20
10:00	223,20
12:00	168,50
13:45	184,00
15:45	180,00
17:45	170,00
20:00	70,00
21:00	0,00

Tab. 7 Změna intenzity osvětlení v průběhu slunečného dne ($n = 5$)

Intenzita radiace v průběhu dne 30. 5. 2008	
čas [hod]	radiace [$\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$]
4:00	0,00
6:00	77,67
8:00	667,00
10:00	1239,33
12:00	1591,67
14:00	1543,33
16:00	1190,67
18:00	591,33
20:00	62,33
22:00	0,00



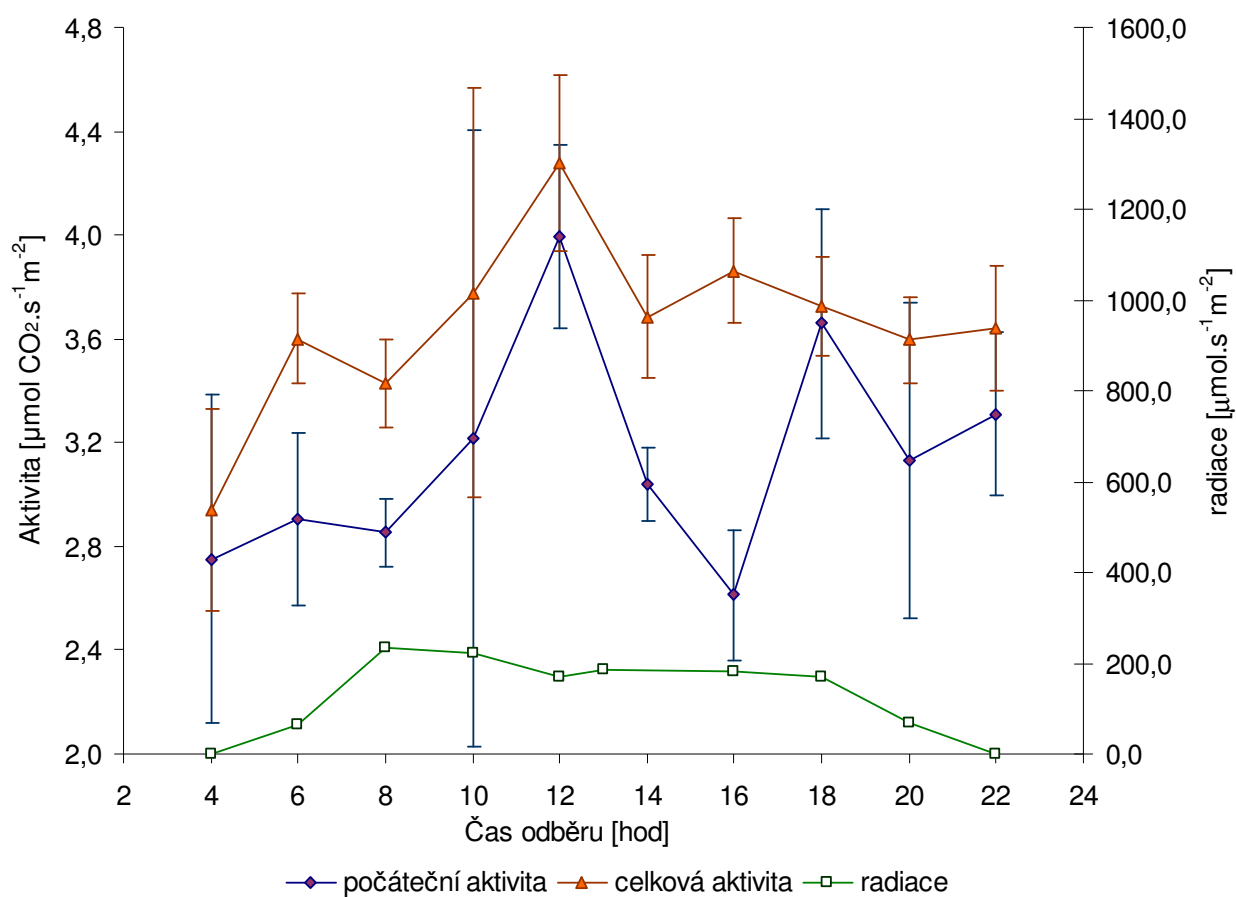
Graf 1 Změna ozáření špenátu zeleného v průběhu 20. 5. 2008 (zataženo) a 30. 5. 2008 (slunečno), ($n = 3$)

Maximum světelné ozářenosti při zataženém dni (20. 5. 2008) bylo dosaženo již v 8:00, poté ozářenost zůstala až do 18 hodin téměř konstantní. Celkově byla světelná ozářenost na velmi nízké úrovni.

U slunečného dne (30. 5. 2008) můžeme pozorovat typickou křivku pro slunečný den s jedním maximem ve 12:00, poté již světelná ozářenost klesala. Intenzita ozáření při slunečném dni byla ve 12:00 téměř desetkrát vyšší než ve dni zataženém.

Tab. 8 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco v průběhu zataženého dne 20. 5. 2008, (n = 5)

20. 5. 2008			
čas odběru [hod]	počáteční aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]	celková aktivita aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]	stupeň aktivace [%]
4:00	2,75	2,94	93,6
6:00	2,90	3,60	80,6
8:00	2,85	3,43	83,2
10:00	3,22	3,78	85,1
12:00	3,99	4,28	93,4
14:00	3,04	3,69	82,4
16:00	2,61	3,86	67,7
18:00	3,66	3,73	98,2
20:00	3,13	3,60	87,0
22:00	3,31	3,64	91,0

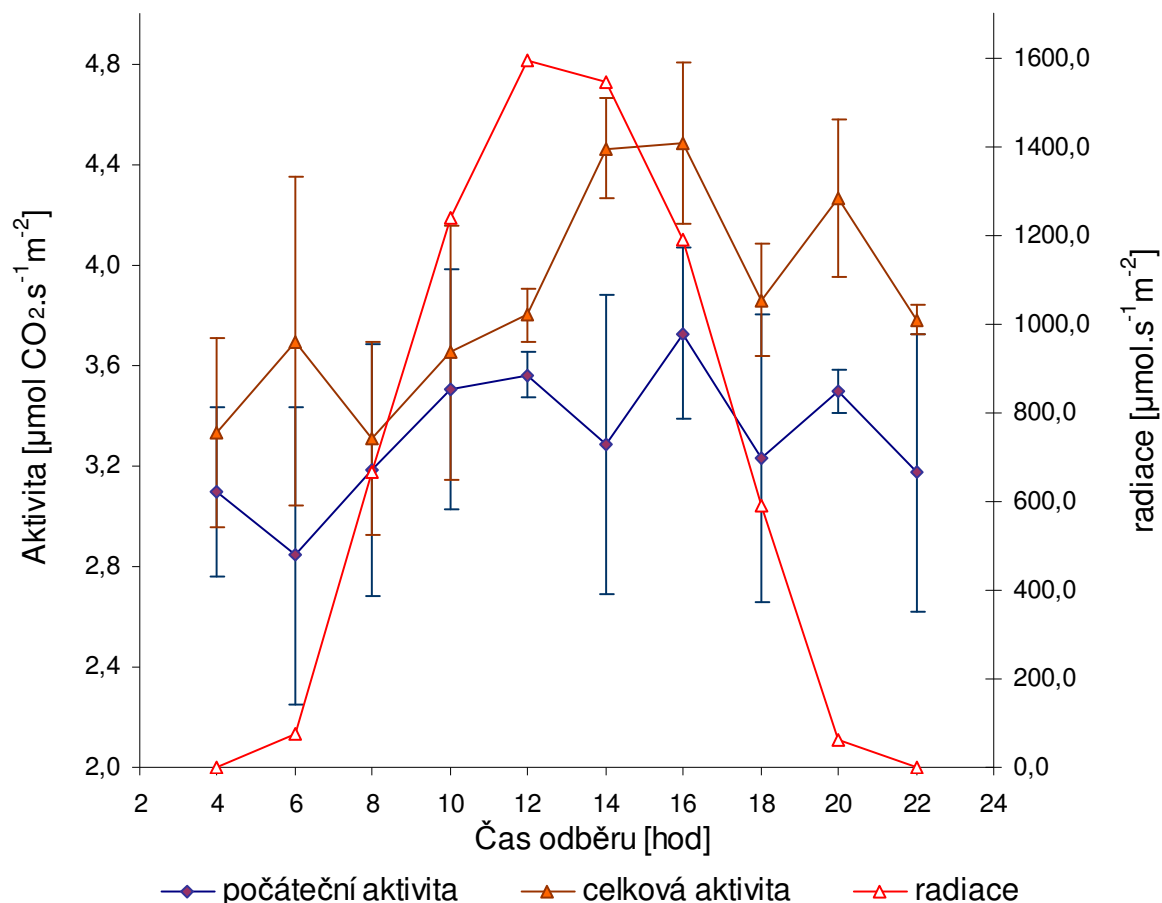


Graf 2 Změny počáteční a celkové aktivity v průběhu zataženého dne 20. 5. 2008 (n = 5) a změna radiace z 20. 5. 2008

Počáteční ani celková aktivita nekopírovaly při zamračeném dni hodnoty ozáření. Ačkoliv ozáření byla od 6:00 do 17:45 téměř konstantní, počáteční i celková aktivita vykazovaly minimální hodnoty před rozedněním a maximální hodnoty v 12:00. Hodnota počáteční a celkové aktivity se od 6:00 do 12:00 zvýšila o 31 % respektive o 16 %. Hodnota celkové aktivity se od 4:00 do 6:00 zvýšila o 20 %, což svědčí o přítomnosti nočního inhibitoru CA1P na aktivním místě Rubisco u špenátu. Počáteční aktivita po dosažení svého maxima v 12:00 prudce klesala až do 16:00, kdy dosáhla odpoledního minima. Tato odpolední deprese činila 35 % a vzhledem k tomu, že celková aktivita byla v té době přibližně konstantní, byla způsobena dekarbamylací aktivních center Rubisco

Tab. 9 Počáteční a celková aktivita enzymu Rubisco v průběhu slunečného dne 30. 5. 2008 (n = 5)

30. 5. 2008			
čas odběru [hod]	počáteční aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]	celková aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2}$]	stupeň aktivace [%]
4:00	3,10	3,34	92,8
6:00	2,84	3,69	76,9
8:00	3,18	3,31	96,2
10:00	3,51	3,65	96,1
12:00	3,56	3,80	93,7
14:00	3,29	4,46	73,6
16:00	3,73	4,48	83,1
18:00	3,23	3,86	83,6
20:00	3,49	4,26	82,0
22:00	3,17	3,78	83,9

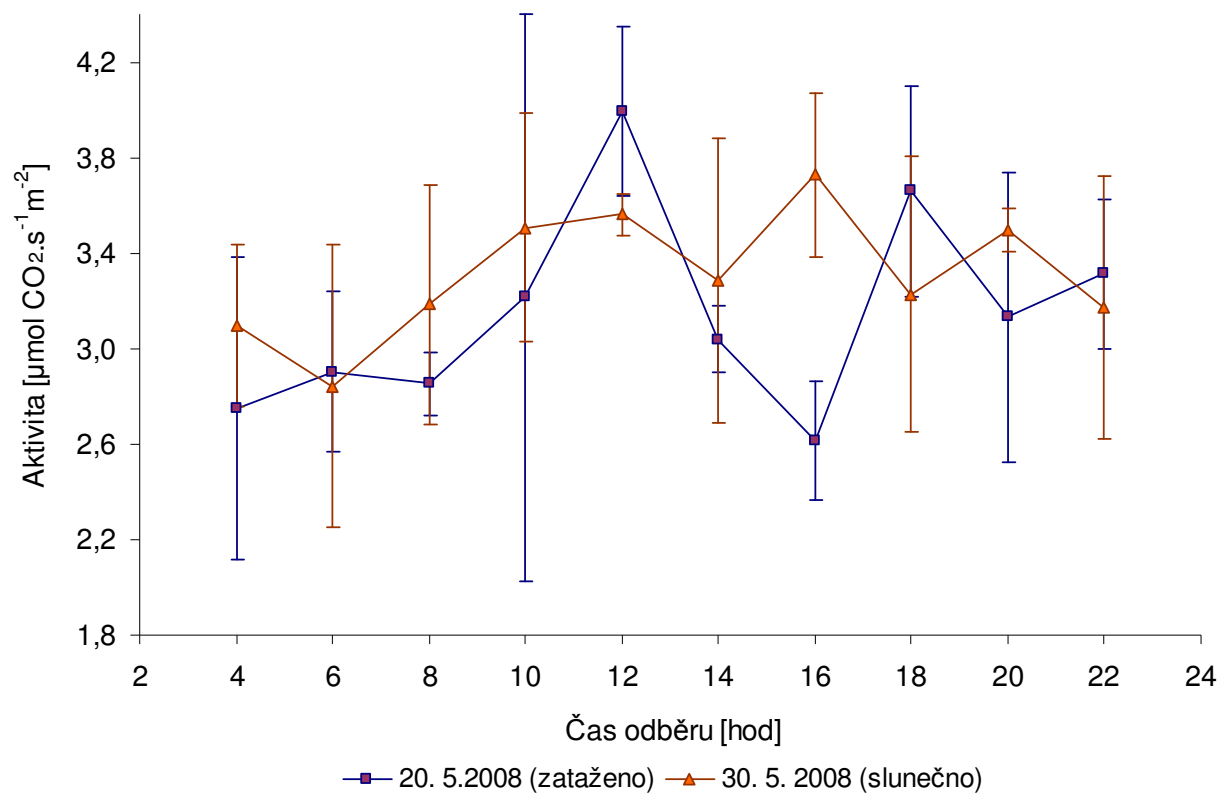


Graf 3 Změna počáteční a celkové aktivity v průběhu slunečného dne 30. 5. 2008 ($n = 5$)

Z grafu 3 je patrné, že intervaly spolehlivosti jsou podstatně větší než u grafu 1, což ztěžuje interpretaci výsledků. Je to způsobeno tím, že zatímco v zamračeném dni, při difuzním světle, byly všechny odebírané listy exponovány stejně, ve slunečném dni se expozice jednotlivých odebíraných listů lišila a důsledkem toho byl i větší rozptyl výsledků. Přesto je na grafu 2 patrný vzestup celkové aktivity po rozednění, dopolední mírný vzestup celkové aktivity a odpolední dekarbamylyace Rubisco.

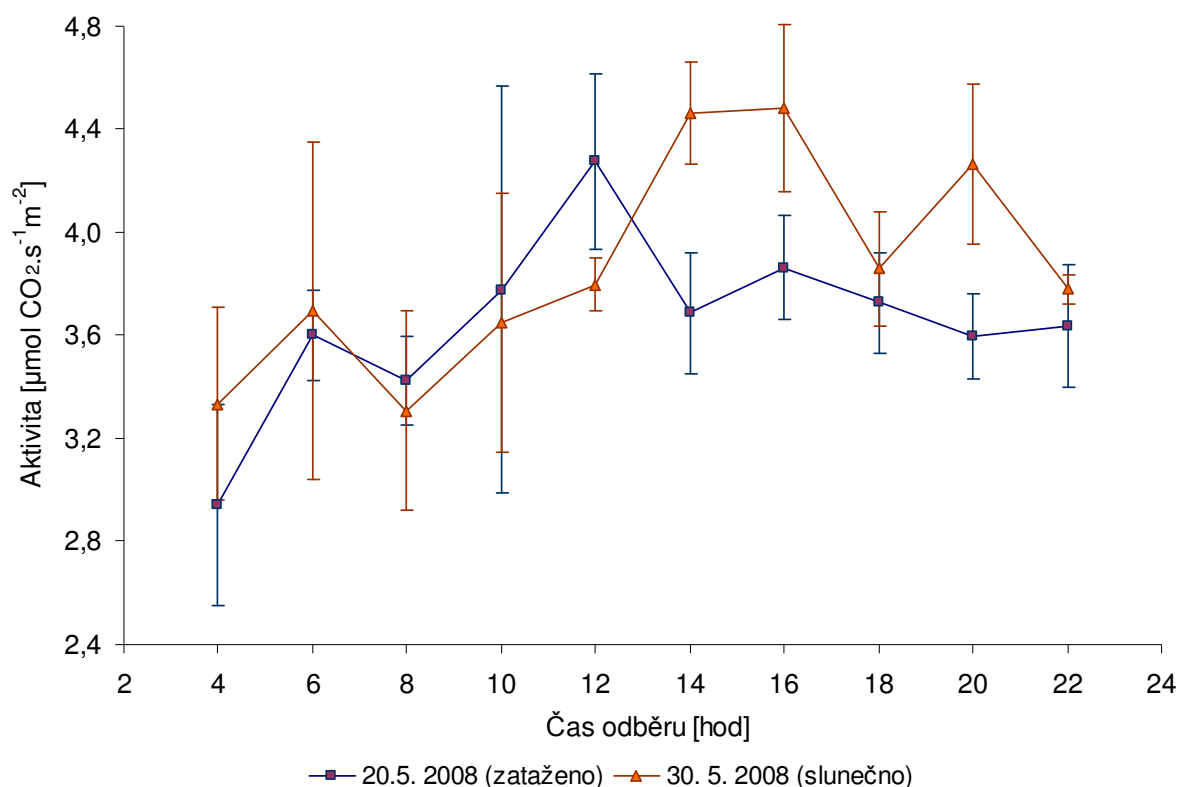
V grafu 2 a 3 je ukázána počáteční a celková aktivita v jednotlivé dny. Celková aktivita měla 20. 5. 2008 (zataženo) podobný průběh jako aktivita počáteční. Nejvíce se od sebe lišily v 16:00, kdy došlo k prudkému poklesu počáteční aktivity.

Denní chod počáteční a celkové aktivity 30. 5. 2008 (slunečno) byl opět podobný. K nejvýraznějšímu rozdílu mezi aktivitami došlo v 16:00.



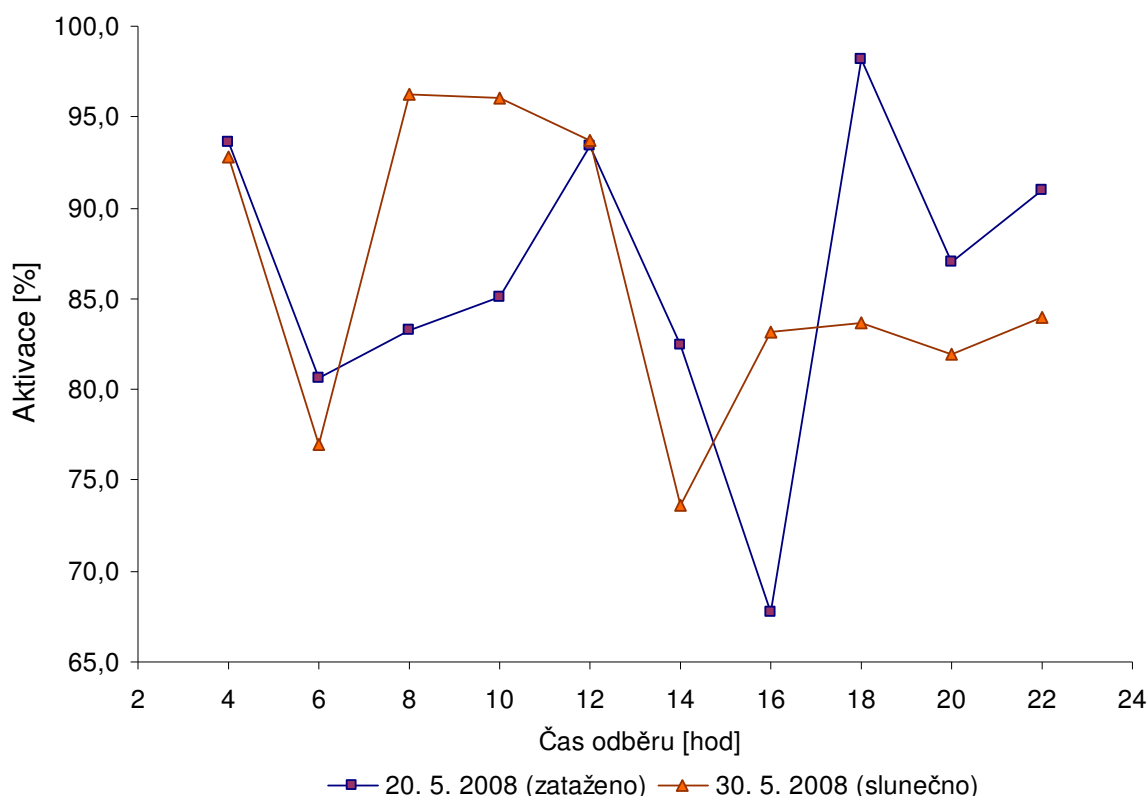
Graf 4 Porovnání počátečních aktivit u slunečného a zataženého dne (n = 5)

Graf 4 ukazuje, že nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi počátečními aktivitami Rubisco při zataženém a slunečném dni, ačkoliv při slunečném dni byla intenzita světelného záření téměř desetkrát větší.



Graf 5 Srovnání celkových aktivit slunečného a zataženého dne ($n = 5$)

Rovněž celkové aktivity Rubisco (graf 5) při zataženém dni nebyly v dopoledních hodinách statisticky významně odlišné od celkových aktivit při slunečném dni. Teprve v odpoledních hodinách byly celkové aktivity při zataženém dni významně nižší (o 14–17 %) než při slunečném dni. Tento pokles celkové aktivity při zataženém dni lze vysvětlit nižší aktivitou aktivasy Rubisco, která má za následek větší akumulaci denních inhibitorů na aktivním místě enzymu



Graf 6 Srovnání změny stupně aktivace v průběhu dne 20. 5. 2008 a 30. 5. 2008 (n = 5)

Stupeň aktivace je ve vzorcích z 20. 5. 2008 i z 30. 5. 2008 velmi vysoký (Graf 6).

20. 5. 2008 byla nejvyšší hodnota aktivace zjištěna v odběrech z 18:00 a to 98 %. Nejnižší hodnota 68 % byla zjištěna v 16:00. K největšímu poklesu došlo v době mezi 12:00 a 16:00 (o 27,5%). Největší vzrůst nastal mezi 6:00 až 10:00 (15,9 %).

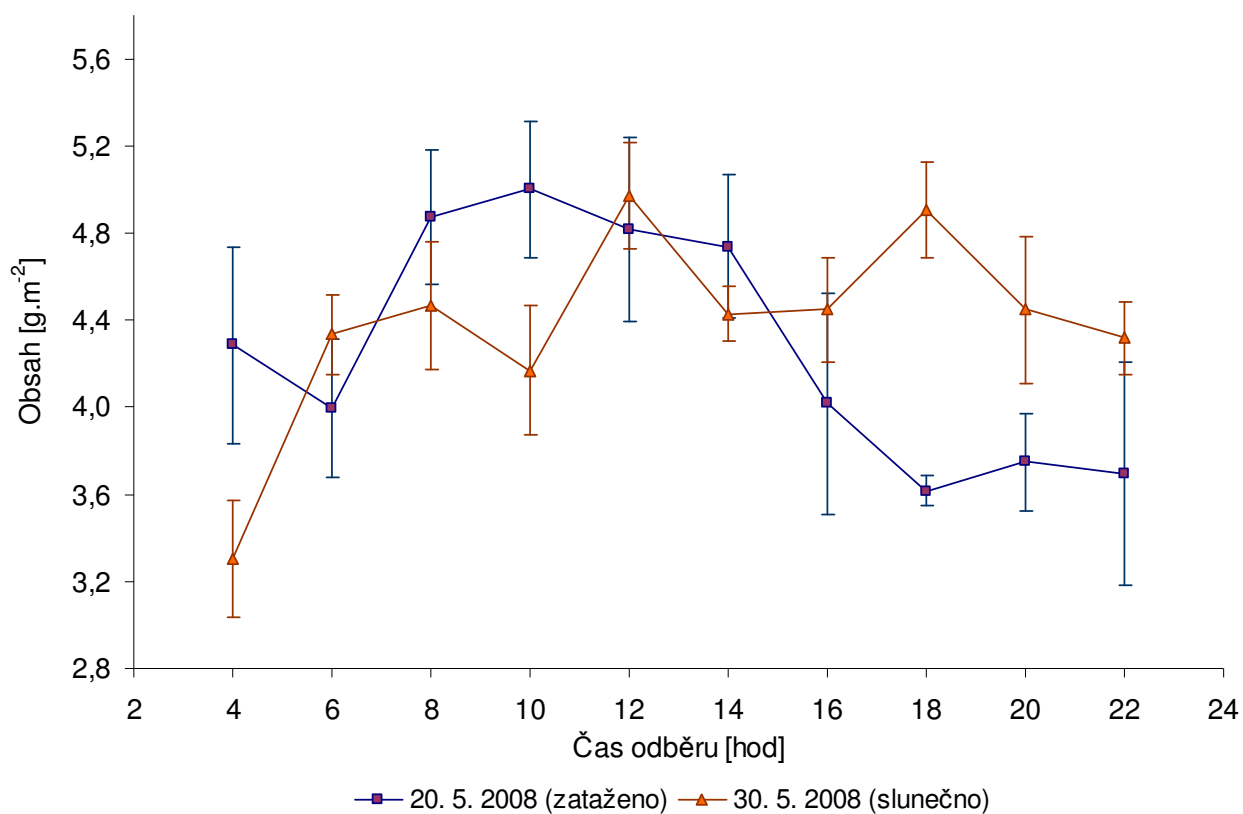
Dne 30. 5. 2008 byla nejvyšší naměřená hodnota aktivace z odběru v 8:00 (96,2 %) a nejnižší hodnota byla zjištěna ve vzorcích ze 14:00 (73,6 %). Největší přírůstek stupně aktivace byl zjištěn mezi 6:00 a 8:00 (o 25,1 %). Naopak největší úbytek byl mezi 12:00 a 14:00 (o 27,3 %).

Průběh aktivace je přibližně podobný jako průběh počáteční aktivity v obou dnech měření.

Změny množství enzymu Rubisco jsou velmi podobné jak u slunečného dne, tak u dne zataženého. U zataženého dne se nejvyšší hodnota od nejnižší liší o 37,7 % a u slunečného dne o 36,1%. 20. 5. 2008 byla nejvyšší hodnota množství enzymu Rubisco zjištěna v odběru ve 12:00 a nejmenší v odběru ve 16:00. U slunečného dne 30. 5. 2008 byly nejvyšší hodnoty ve vzorcích odebraných ve 12:00 a nejnižší ve 4:00.

Tab. 10 Změna obsahu Rubisco ($n = 5$)

	20. 5. 2008	30. 5. 2008
čas [hod]	c [g m ⁻²]	c [g m ⁻²]
4	4,29	3,30
6	3,99	4,33
8	4,88	4,47
10	5,00	4,17
12	4,82	4,97
14	4,74	4,43
16	4,02	4,45
18	3,62	4,90
20	3,75	4,45
22	3,69	4,32

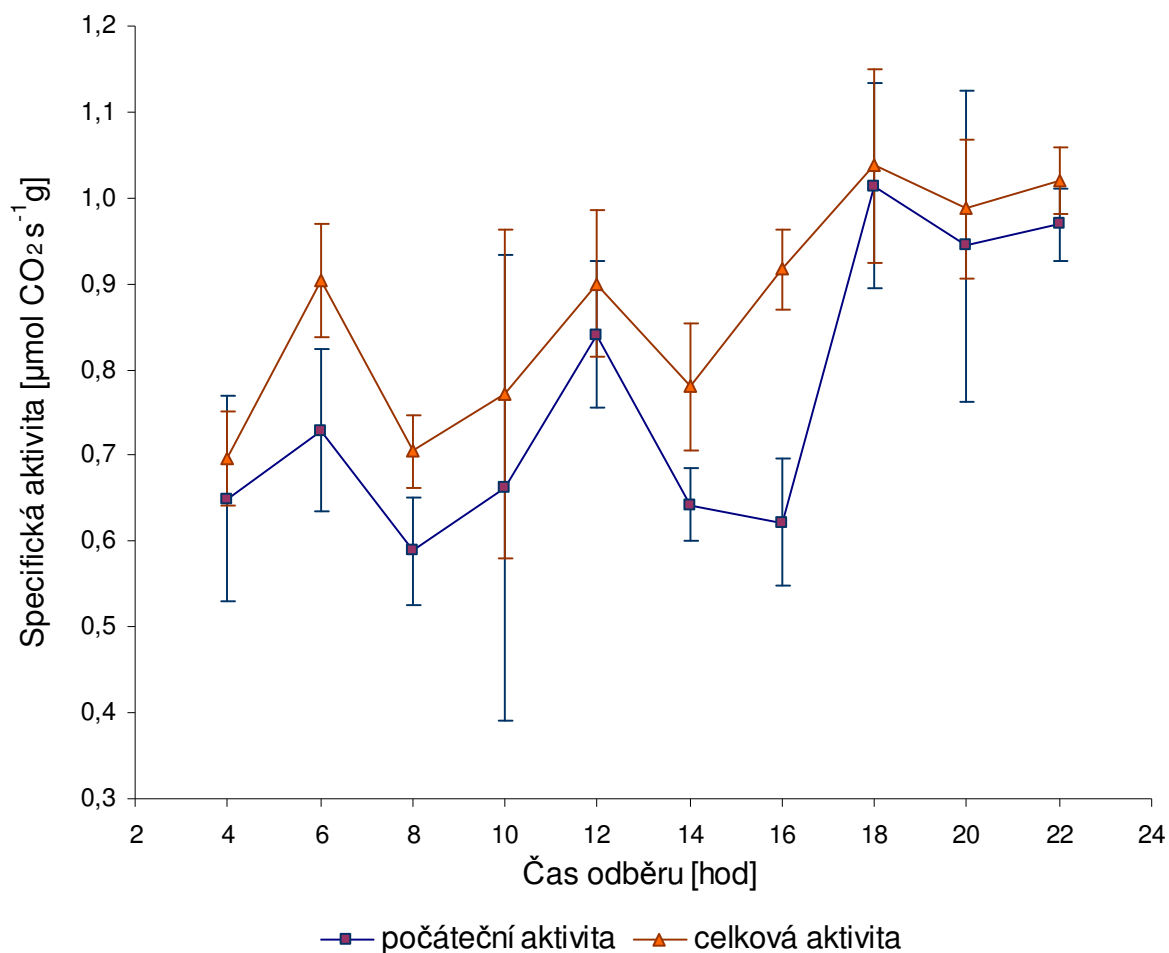


Graf 7 Změna obsahu enzymu Rubisco v průběhu 20. 5. 2008 a 30. 5. 2008 ($n = 5$)

Hodnoty obsahu enzymu Rubisco se během dne statisticky významně neměnily. Výjimku tvoří pouze hodnoty v 18:00 20. 5. 2008 a ve 4:00 30. 5. 2008, které jsou výrazně nižší než ostatní hodnoty.

Tab. 11 Specifické aktivity 20. 5. 2008 ($n = 5$)

Čas odběru	Specifická počáteční aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}$]	Specifická celková aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}$]
4	0,65	0,70
6	0,73	0,90
8	0,59	0,70
10	0,66	0,77
12	0,84	0,90
14	0,64	0,78
16	0,62	0,92
18	1,01	1,04
20	0,94	0,99
22	0,97	1,02



Graf 8 Specifická aktivita enzymu Rubisco v průběhu 20. 5. 2008 (zataženo), ($n = 5$)

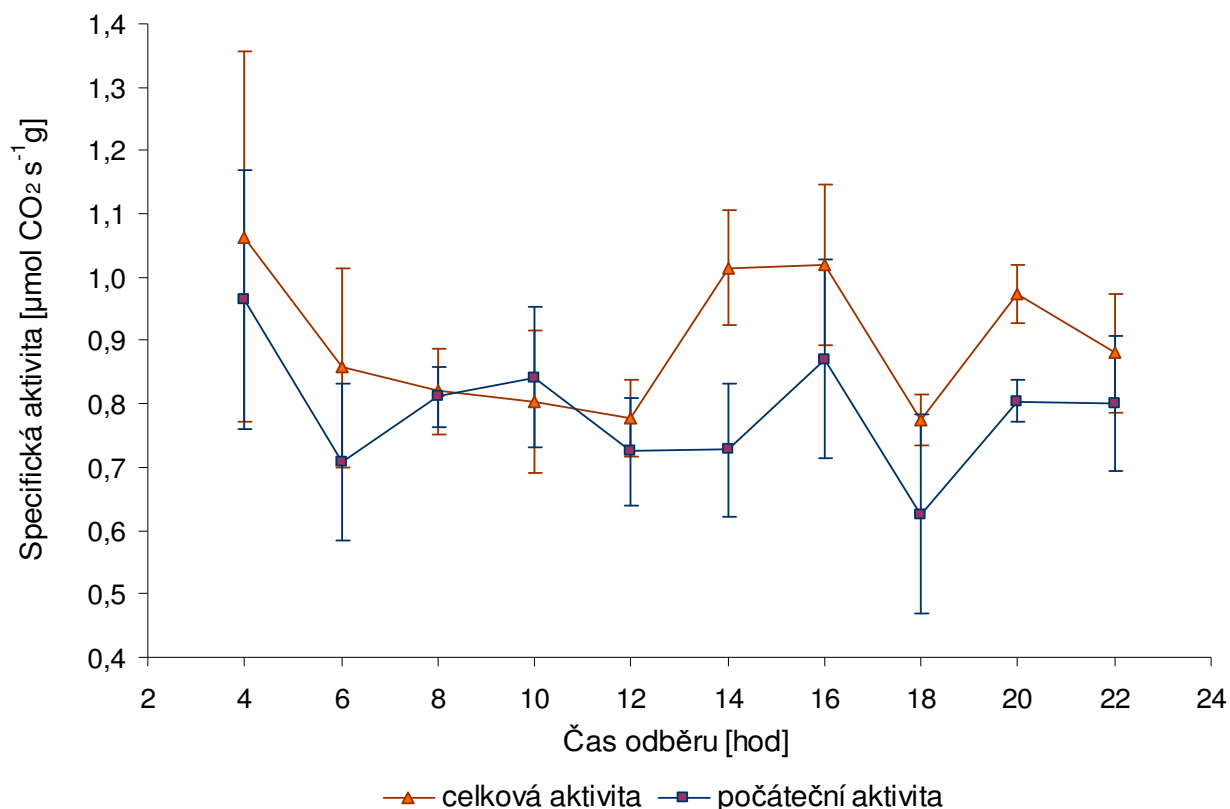
Specifická aktivita enzymu Rubisco je aktivita vztažená na obsah enzymu Rubisco. Dne 20. 5. 2008, specifická počáteční aktivita od 4 hodin až do 6. hodiny stoupala. Mezi 6. až 8.

hodinou došlo k jejímu snížení. Od 8. až do 12. hodiny stoupala a následně až do 16 hodiny klesala. Od 16. hodiny až do konce měření až na pokles ve 20 hodin stoupala. Maximální hodnota byla zjištěna ve 22 hodin a minimální hodnota v 8 hodin.

Specifická aktivita celková od 4. do 6. hodiny stoupala. Mezi 6. až 8. hodinou klesala, poté se zvyšovala až do konce měření až na snížení naměřené ve 14 hodin a ve 20 hodin. Maximální celková specifická aktivita byla zjištěna ve 22 hodin a minimální ve 4 hodiny.

Tab. 12 Specifické aktivity 30. 5. 2008 (n = 5)

Čas odběru	Specifická počáteční aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}$]	Specifická celková aktivita [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ g}$]
4	0,96	1,06
6	0,71	0,86
8	0,81	0,82
10	0,84	0,80
12	0,72	0,78
14	0,73	1,01
16	0,87	1,02
18	0,63	0,77
20	0,80	0,97
22	0,80	0,88



Graf 9 Specifická aktivita v průběhu 30. 5. 2008 (slunečno), ($n = 5$)

Specifická aktivita enzymu Rubisco 30. 5. 2008 více kolísala. Specifická aktivita počáteční i celková prudce klesaly až do 6 hodiny. Následně se specifická aktivita počáteční mezi 6. hodinou až 10. hodinou mírně zvyšovala a opět snižovala. Od 12 hodiny až do 14 zůstávala téměř konstantní. A poté se opět do 16. hodiny zvyšovala a následně klesala do 18 hodiny. Mezi 18. hodinou až 20. hodinou opět rostla. Od 20 hodiny až do konce měření se neměnila. Maximální hodnota byla dosažena ve 4 hodiny a minimální v 18 hodin.

Specifická celková aktivita klesala až do 12. hodiny, poté až do 16. hodiny rostla. Mezi 16 až 18. hodinou nastal pokles a poté opět nárůst do 20. hodiny. Od 20. hodiny až do konce měření specifická aktivita mírně klesala. Maximální hodnota byla zjištěna ve vzorku ze 4. hodiny a minimální hodnota z 18 hodin.

4.2. Diskuse

V experimentu byl sledován vliv rozdílných světelných podmínek na aktivitu a obsah enzymu Rubisco. Špenát byl pěstován volně na zahradním záhonu a jeho odběry byly provedeny uprostřed vegetačního období rostliny.

4.2.1. Aktivita enzymu Rubisco v průběhu dne

Vzrůst celkové aktivity po rozednění je důkazem přítomnosti nočního inhibitoru CA1P u špenátu, což je v rozporu se závěry Servaitese [50]. Statisticky významný nárůst celkové aktivity mezi 8. a 12. hodinou lze přičíst postupnému uvolňování denních inhibitorů z aktivních míst Rubisco, jež bylo způsobeno rostoucí aktivitou aktivasy Rubisco vlivem

stoupající radiace. Odpolední deprese počáteční aktivity Rubisco je způsobena dekarbamylací Rubisco, neboť není doprovázena poklesem celkové aktivity.[51], [52], [53]

Jak už bylo řečeno, hodnoty aktivit v průběhu slunečného dne měly u různých listů větší rozptyl, neboť různé listy byly v důsledku různé orientace poněkud odlišně exponovány. Tato skutečnost se projevuje jako větší intervaly spolehlivosti a ztěžuje interpretaci výsledků. Z naměřených hodnot je přesto zřejmé, že celková aktivita Rubisco byla v poledne významně vyšší než před rozedněním, což opět ukazuje na vliv nočního inhibitoru CA1P. Obdobně jako při zataženém dni došlo i při slunečném dni k odpolední depresi Rubisco, evidentně způsobené dekarbamylací enzymu.

Velmi překvapivé je zjištění, že aktivity při tak extrémně odlišných světelných podmínkách nejsou významně odlišné. Tento závěr je v rozporu se zjištěním většiny autorů, [45], [54], [56]. Hodnoty ozáření při zataženém dni ($180\text{--}236\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^2$) byly hluboko pod hranicí saturační ozáření ($600\text{--}800\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^2$). To znamená, že při zataženém dni byla pravděpodobně limitujícím faktorem aktivity Rubisco nízká ozáření. Naproti tomu za slunečného dne při vysoké ozáření mohla být aktivita Rubisco limitována nízkým parciálním tlakem CO_2 v chloroplastech, kdy průduchy rostliny byly zavřeny vlivem déletrvajícího sucha. Toto tvrzení potvrdil i Pons et al. [58], který zjistil nepřímý vliv vysoké teploty na pokles vodivosti průduchů a tím na následný pokles dostupného CO_2 v chloroplastech. Vztah mezi vodivostí průduchů, fotosyntézou byl zjištěn i Jiang et. al. [57].

4.2.2. Obsah enzymu Rubisco v průběhu dne

Obsah enzymu byl zjišťován ve stejných intervalech, jako aktivita enzymu. Ve většině prací [55] bylo množství zjištěné ve vzorcích téměř konstantní. Pouze studie Wang et. al [45] uvádí že obsah Rubisco se dopoledne mírně zvyšuje a to až do poledne, kdy dosáhne nejvyšší hodnoty a poté mírně klesá. Ke stejnému výsledku jsme došli i v našem experimentu. Do 12. hodiny obsah Rubisco v obou dnech, zataženém i slunečném, stoupal a poté až do ukončení měření v 22 hodin klesal. Naproti tomu Pérez et al. [59] uvádějí, že obsah Rubisco u pšenice byl maximální před rozedněním a v průběhu dne mírně klesal až do setmění. Podobně Nie et al. [60] uvádějí, že obsah transkriptů zodpovědných za syntézu Rubisco u pšenice byl maximální v 6 hodin ráno a v průběhu dne postupně klesal přibližně do 16–17 hodin, kdy dosáhl svého minima. Cheng et al. [61] zkoumali diurnální cyklus transkriptů *rbcS* (pro malou podjednotku Rubisco) u *Arabidopsis thaliana*. Expres genů *rbcS* byla nejvyšší na začátku dne (asi v 6 hodin), potom následoval pokles do 12 nebo 17 hodin (podle druhu transkriptu) a poté opět vzestup až do 6 hodin ráno. Rozsah kolísání transkriptů činil až 60 %. Protože kolísání obsahu Rubisco bylo antiparalelní k obsahu listových sacharidů, autoři předpokládali, že zvýšený obsah listových sacharidů mohl reprimovat geny pro Rubisco a postupně vést ke snížení jeho obsahu v průběhu dne. V noci, kdy byly listové sacharidy alokovány do zásobních orgánů, se postupně obsah Rubisco zase zvýšil na původní úroveň.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit vliv rozdílné ozářenosti na aktivitu a obsah enzymu Rubisco v listech špenátu. Rostliny špenátu byly pěstovány na zahradním záhoně. Listy špenátu byly odebírány ve dvou klimaticky odlišných dnech, 20. 5. 2008 (zataženo) a 30. 5. 2008 (slunečno). Odběr probíhal vždy od 4:00 do 22:00, po časovém intervalu 2 hodin. Ve stejných časových intervalech byla také měřena ozářenost v místě odběru vzorků.

U vzorků byla stanovena počáteční a celková aktivita a obsah enzymu Rubisco. Pro stanovení aktivit byla použita spektrofotometrická metoda podle Lilleyho a Walkera [48] s extrakcí podle Besforda [49]. Obsah enzymu Rubisco byl stanoven metodou SDS-PAGE.

U obou dnů, aktivity u vzorků špenátu odebraných před úsvitem byly nízké, po rozednění však vzrostly a v poledne byly významně vyšší. Vzrůst aktivit byl způsoben zvýšením radiace, která způsobila uvolnění inhibitoru CA1P z aktivních míst Rubisco. Rubisco tak mohlo být aktivováno.

U zataženého dne bylo dosaženo pouze nízkých hodnot aktivit, což bylo způsobeno nízkou ozářeností, která nedosahovala hranice saturační ozářenosti.

Naopak u slunečného dne byla ozářenost vysoká, ale přesto zjištěná aktivita nedosahovala příliš vysokých hodnot. Toto mohlo být způsobeno vysokou ozářeností, vysokou teplotou a suchem. Důsledkem těchto vlivů byl nízký parciální tlak CO_2 v chloroplastech a tedy nedostupnost CO_2 v chloroplastech.

Oproti očekáváním, díky působení klimatických vlivů, nebylo možné ze zjištěných hodnot pozorovat významné rozdíly v aktivitách obou dnů.

Stejně jako u zataženého dne došlo i v slunečném dni k odpolední depresi enzymu Rubisco, evidentně způsobené dekarbamylací enzymu Rubisco a patrně také došlo k snížení obsahu Rubisco aktivas. Vliv odpolední deprese byl patrný hlavně u počátečních aktivit.

Změna obsahu enzymu Rubisco nevykazovala po oba dny měření shodný průběh. V průběhu zataženého dne obsah enzymu nevykazoval statisticky významné rozdíly, naproti tomu u slunečného dne došlo k mírnému zvýšení obsahu v poledních až odpoledních vzorcích. Toto kolísání obsahu enzymu Rubisco mohlo být způsobeno potlačením syntézy *rbcs* a *rbcl*, které ovlivňují syntézu Rubisco.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CLELAND, W. W., et al. Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base. *Chemical Reviews* [online]. 1998 [cit. 2009–04-20].
- [2] *Extrakce a spektrofotometrické stanovení chlorofylů a + b* [online]. [2009], Poslední (větší) aktualizace 16. února 2009 [cit. 2009–04-15]. Dostupné na Internetu: <<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/chlorofyly.htm>>.
- [3] CAMBELL, N. A., REECE, J. B. *Biologie*. Brno: Computer press, 2006. s. 176–194.
- [4] *Eapbiofield* [online]. c2009 [cit. 2009–02-14]. Dostupné na Internetu: <<https://eapbiofield.wikispaces.com/10.1+and+10.2+tate>>.
- [5] VOET, D., VOET, J. G. *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha 1995.
- [6] 25. *Fotosyntéza* [online]. [2000] [cit. 2009–04-12]. Dostupné na Internetu: <http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/25-Fotosyntesa/25-Fotosyntesa.htm>.
- [7] LEEGOOD, R. C., SHARKEY, T. D., von CAEMMERER, S. Photosynthesis: Physiology and Metabolism. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht 2000.
- [8] *Chapter 10 Photosynthesis : 10.3 The Calvin Cycle uses ATP and NADPH to convert CO₂ to sugar* [online]. c2009 [cit. 2009–04-24]. Dostupné na Internetu: <<https://eapbiofield.wikispaces.com/Chapter+10+Photosynthesis+AK>>.
- [9] PARRY, M. A. J., ANDRALOJC, P. J., PARMAR, S. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. *Plant, Cell and Environment*, 1997, roč. 20, s. 528–534.
- [10] GUTTERIDGE, S., GATENBY, A. A. Rubisco Synthesis, Assembly, Mechanism, and Regulation. *Plant Cell* [online]. 1995, roč. 7 [cit. 2009–08-21]. Dostupné na Internetu: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=160870&blobtype=pdf>>.
- [11] HRSTKA, M., et. al. Diurnal regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity and its content in Norway spruce needles. *Photosynthetica*, 2007, roč. 43, s. 334–339.
- [12] NISHIMURA, K., et al. Molecular mechanisms of Rubisco biosynthesis in higher plants. *Plant Biotechnology* [online]. 2008, roč. 25 [cit. 2009–04-21]. Dostupné na Internetu: <http://www.wdc-jp.biz/pdf_store/jspcmb/pdf/pb25_3/25_285.pdf>.
- [13] ANDERSSON, I., BACKLUND, A. Structure and function of Rubisco. *ScienceDirect* [online]. 2008, roč. 46 [cit. 2009–04-06], s. 275–291. Dostupné na

Internetu: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VRD-4RJYV3S-3&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1050877008&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7eeb5bb803b0e26ef52bb40e86d8cade>.

- [14] MACHOLÁN, L., et al. *Enzymologie*. Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 1983. s. 75.
- [15] HARTMAN, F. C., HARPEL, M. R. Structure, funkcion, regulativ and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Ann. Rev. Biochem.*, 1994, roč. 63, s. 197–234.
- [16] TAYLOR, T. C., ANDERSSON, I. The Structure of the Complex between Rubisco and its Natural Substrate Ribulose 1,5-bisphosphate. *ScienceDirect* [online]. 1997, roč. 256 [cit. 2009–04-21]. Dostupné na Internetu: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WK7-45NJP76-2F&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=936929c78467ef56b61710945065ab16>.
- [17] TAYLOR, T. C., ANDERSSON, I. Structure of Product Complex of Spinach Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Biochemistry* [online]. 1997, roč. 36 [cit. 2009–05-21], s. 4041–4046. Dostupné na Internetu: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi962818w>>.
- [18] MORAN, L. A. *Fixing Carbon: the Rubisco reaction* [online]. 2007 [cit. 2009–05-03]. Dostupné na Internetu: <<http://sandwalk.blogspot.com/2007/07/fixing-carbon-rubisco-reaction.html>>.
- [19] CRONK, J. D. *Lecture 12. CO₂ fixation by RuBisCO* [online]. [2007], poslední revize 27. 12. 2006 [cit. 2009–05-01]. Dostupné na Internetu: <<http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/chemistry/CHEM445/lectures.cfm?L=12>>.
- [20] LORIMER, G. H. Evidence for the existence of discrete activator and substrate sites for CO₂ on Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 1979, roč. 254 [cit. 2009–04-14], s. 5599–5601. Dostupné na Internetu: <<http://www.jbc.org/cgi/reprint/254/13/5599.pdf>>.
- [21] PORTIS, A. R. Jr. Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, 2003, roč. 75, s. 11–27.

- [22] BELKNAP, W., PORTIS, A. Exchange Properties of the Activator CO₂ of Spinach Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiology* [online]. 1985, roč. 80 [cit. 2009-04-14]. Dostupné na Internetu: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1075187>>.
- [23] JENSEN, R. G. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO₂. *PNAS* [online]. 2000, roč. 97, č. 24 [cit. 2009-06-16]. Dostupné na Internetu: <<http://www.pnas.org/content/97/24/12937.full>>.
- [24] *Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy gazometricky* [online]. 2009, poslední aktualizace 16. 2. 2009 [cit. 2009-04-14]. Dostupné na Internetu: <<http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/gazometrie.pdf>>.
- [25] HNILIČKA, F.. *Fyziologie rostlin cvičení: Fotosyntéza-metody* [online]. 2005 [cit. 2009-04-26]. Dostupné na Internetu: <<http://kbfr.agrobiologie.cz/kbfr/hnilicka/prednasky/fyziologie-rostlin/fyznemrostlin/metody/metodyfoto.pdf>>.
- [26] *LI – 6400 Gazometrické stanovení fotosyntetických parametrů* [online]. 2008 [cit. 2009-04-26]. Dostupné na Internetu: <http://kfr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_U05-Gazometrie-2008.pdf>.
- [27] DU, Y., et al. An improved spectrophotometric determination of the activity of ribulose 1,5-bisphosphate. *Jpn. J. of Crop Sci.* [online]. 1996, roč. 65 [cit. 2009-04-26]. Dostupné na Internetu: <<http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/JASI/pdf/society/55-1168.pdf>>.
- [28] *Absorption / Transmission / Reflectance (ATR) Spectroscopy : The Beer-Lambert Law* [online]. c2009 [cit. 2009-04-22]. Dostupné na Internetu: <<http://www.andor.com/learn/applications/?docID=189>>.
- [29] VODRÁŽKA, Z., RAUCH, P., KÁŠ, J. *Enzymologie*. 2. bez upřesnění vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. s. 122–123.
- [30] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. s. 33–54.
- [31] HERINGOVÁ, P. *Aktivita enzymu Rubisco u smrku ztepilého v průběhu dne*. Brno: VUT Brno. Chemická fakulta. Ústav potravinářské chemie a biotechnologie, 2004. 50 s.
- [32] KRÁLOVÁ, B., et al. *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. 254 s.

- [33] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. s. 33–36.
- [34] FRÉBORT, I. *Elektroforéza proteinů* [online]. [2007] [cit. 2009–04-24]. Dostupné na Internetu: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/1.%20Elektroforeza%20proteinu.pdf>>.
- [35] KOTRBOVÁ-KOZAK, A., et al. 5. *SEPARACE A DETEKCE PROTEINŮ II: 5.1. SDS-PAGE* [online]. [2008] [cit. 2009–04-12]. Dostupné na Internetu: <http://old.lf3.cuni.cz/studium/materialy/modul1b/cj/5.1_sds-page.ppt>.
- [36] SOBOTKA, R. *Trocha teorie o kapilární elektroforéze* [online]. [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: <<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/lamb/>>.
- [37] *Elektroforéza, Kapilární elektroforéza* [online]. [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: <http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:Hen3hX0zMeUJ:www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/cze/CZE.pdf+kapil%C3%A1rn%C3%AD+elektrofor%C3%A9za&hl=cs&gl=cz&pid=bl&srcid=ADGEESiJeC4X1vSemTGi2uTN-cH_zHRczc2gwN85VZXsHYDubBu8aYlsCgDQy_GqEKI2JGFfrRWFC39nLqGZ7yDu4SsXsNFTiqiEIMc5Km67NRh5za3fuTFhUdrYeV71-KfLo0j7obwp&sig=AFQjCNFJdMaq2RDJDQKkxB6ZBMA9HeJgnA>.
- [38] WARREN, C. R. The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO₂ movement is increased by nutrient supply, *Journal of Experimental Botany* [online]. 2004, roč. 55, č. 406 [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: <<http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/reprint/55/406/2313>>.
- [39] ANTONOV, Y., SOSHINSKY, A. Interactions and compatibility of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin in aqueous medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000, roč. 27, s. 279–285.
- [40] SHEN, L., ZHENG-YU, W., MASAYUKI, K., TSUNENORI, N. The Dimerization of Folded Monomers of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, roč. 10, s. 7023–7026.
- [41] ZACHOVÁ, L. *Účinek zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na množství a aktivitu enzymu Rubisco*. Brno: VUT Brno. Chemická fakulta. Ústav potravinářské chemie a biotechnologie, 2008. 56 s.
- [42] DECKER, J., M. *Imunology ELISA* [online]. 2006, poslední aktualizace 1. 2. 2006 [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: <<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/ToolBox/elisa.html>>.

- [43] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy* [online]. 2006, [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: < http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/ebook.obsah.htm>.
- [44] NASSOURY, N., LAWRENCE, F., MORSE, D. Circadian Changes in Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Distribution Inside Individual Chloroplast Can Account For the Rhythm in Disnoflagellate Carbon Fixion. *The Plant Cell* [online]. 2001, roč. 13 [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: < <http://www.plantcell.org/cgi/content/full/13/4/923>> .
- [45] WANG, N. Y., et al. Diurnal Changes of Rubisco and RCA Activities and Their Cellular Localization in Rice. *Acta Botanica Sinica* [online]. 2003, roč. 45 [cit. 2009–04-26]. Dostupné na Internetu: <<http://www.jipb.net/pubsoft/content/2/3506/x020495.pdf>>.
- [46] SUGIYAMA, T., MIZUNO, M., HAYASHI, M. Partitioning of Nitrogen among Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase, Phosphoenolpyruvate Carboxylase, and Pyruvate Orthophosphate Dikinase as Related to Biomass Productivity in Maize Seedlings. *Plant Physiology* [online]. 1984, roč. 75 [cit. 2009–10-22]. Dostupné na Internetu: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/75/3/665>>.
- [47] Grubben, G. J. H., Denton, O. A. *Prota 2: Vegetables/Légumes Record display* [online], [cit. 200910–22]. Dostupné na Internetu: < http://database.prota.org/PROTAhtml/Spinacia%20oleracea_En.htm>.
- [48] LILLEY, R. M., WALKER, D. A. An improved spectrophotometric assay for ribulose carboxylase. *Biochem Biophys. Acta*, 1997, roč. 358, s. 226–229.
- [49] BESFORD, R. T. Some properties of ribulose bisphosphate carboxylase extracted from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1984, roč. 35, č. 153, s. 495–504.
- [50] SERVAITES, J. C., et al. Species Variation in the Predawn Inhibition of Ribulose- 1,5- Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiology* [online]. 1986, roč. 82 [cit. 2009–05-21]. Dostupné na Internetu: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/82/4/1161>>.
- [51] SINGSAAS, E. L., ORT, D. R., DELUCIA, E. H. Diurnal Regulation of Photosynthesis in Understory Saplings. *New Phytologist*, 2000, roč. 145, č. 1, s. 39–49.
- [52] MOORE, B. D., KOBZA, J., SEEMANN, J. Measurement of 2-Carboxyarabinitol 1-Phosphate in Plant Leaves by Isotope Dilution. *Plant Physiology* [online]. 1991, roč. 96 [cit. 2009–05-24]. Dostupné na Internetu: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1080734>>.

- [53] SINHA, A. K., et al. Midday depression in photosyntheses: Effect on sucrose-phosphate synthase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in leaves of *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *Photosynthetica*, 1997, roč. 34, s. 115–123.
- [54] SERVAITES, J. C., TORISKY, R. S., CHAO, S. F. Diurnal Changes in Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase Activity and Activation State in Leaves of Field-grown Soybeans. *Plant Science Letters*, 1984, roč. 35, s. 115–121.
- [55] JIANG, D. A., XU, Y. F. Diurnal Changes of Photosynthetic Rate, Stromatal Conductance and Rubisco in Rice Leaf. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1996, roč. 22, s. 94–100.
- [56] CAEMMERER, S., EDMONDSON, D.L. The relationship between steady state gas exchange in vivo RuP₂ carboxylase activity and some carbon cycle intermediates in *Raphanus sativus*. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 669–688, 1986.
- [57] JIANG, D. A., HIRASAWA, T., ISHIHARA, K. The Difference of Diurnal Changes in Photosynthesis in Rice Plants with Different Root Activities Induced by Soluble Scharch Application to the Soil. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 1994, roč. 63, s. 539–545.
- [58] PONS, T. L., WELSCHEN, R. A. M. Midday depression of net photosynthesis in the tropical rainforest tree *Eperua grandiflora*: contribution of stomatal and internal conductances, respiration and Rubisco functioning. *Tree Physiology*, 2003, roč 23, s. 937–947.
- [59] PÉREZ, P., MORCUENDE, R., DEL MOLINO, I.S., MARTÍNEZ-CARRASCO, R. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂ temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ. Exp. Botany* 53: 13–27, 2005.
- [60] NIE, G., HENDRIX, D.L., WEBBER, A.N. et al. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ concentration in the field. *Plant Physiol.* 108: 975–983, 1995.
- [61] CHENG, S.-H., MOORE, B.D., SEEMENN, J.R. Effects of short- and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 116: 715–723, 1998.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	adenosin-5'-difosfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BSA	bovinní sérový albumin
CA1P	2-karboxyarabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol-1,5-bisfosfát
cDNA	cyklická DNA
CKABP	karboxy-3-keto-D-arabonitol-1,5-bisfosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, základní metoda imunologie
FAR	fotosynteticky aktivní radiace
FBPasa	fruktobisfosfatasa
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
IgG	imunoglobulin
IGRA	infračervený analyzátor plynu
NADH	nikotinamidadeninnukleotid
NADPH	nikotinadeninnukleotidfosfát
mRNA	mediátorová RNA
3PGA	3-fosfoglycerát
2PG	2-fosfoglykolát
R5P	ribosa-5-fosfát
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SBPasa	sedoheptulosabisfosfatasa
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-Page	elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát